

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年9月16日 (16.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/078958 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 9/02,
D06P 3/08 // (C12N 9/02, C12R 1:645)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002725

(22) 国際出願日: 2004年3月4日 (04.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-62454 2003年3月7日 (07.03.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
マンドム (MANDOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒
540-8530 大阪府 大阪市 中央区十二軒町5番12号
Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 辻野 義雄
(TSUJINO, Yoshio) [JP/JP]; 〒658-0003 兵庫県 神戸市
東灘区本山北町4-7-54 Hyogo (JP). 園藤 勝義
(ENDO, Katsunori) [JP/JP]; 〒658-0051 兵庫県 神戸市
東灘区住吉本町2-6-12 Hyogo (JP). ハサンアブル カイル ムハマド カムルル (HASAN Abul Khaer
Mohamad Quamrul) [BD/JP]; 〒658-0032 兵庫県 神戸
市 東灘区向洋町中5-5-53 1-7 22 Hyogo (JP).
大塚 香織 (OTSUKA, Kaori) [JP/JP]; 〒921-8135 石川
県 金沢市 四十万四丁目2番地201号 Ishikawa
(JP).(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591
大阪府 大阪市 中央区大手前一丁目7番31号 OMM
ビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka
(JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
/続葉有/

(54) Title: NEUTRAL PHENOL OXIDASE

(54) 発明の名称: 中性フェノールオキシダーゼ

(57) Abstract: A neutral phenol oxidase which shows little change in the optimum pH from substrate to substrate and a high enzymatic activity at around neutrality, a process for producing the same and an antibody against the neutral phenol oxidase. This neutral phenol oxidase can be obtained by culturing a basidiomycete belonging to the genus *Flammulina* at pH 6.0 to 12.0. Use of this neutral phenol oxidase makes it possible to dye fibers, hair, etc. while lessening effects on the environment, the human body and so on.

(57) 要約:

本発明は、種々の基質に対して、基質による至適 pH の変動が小さく、中性付近で高い酵素活性を有する中性フェノールオキシダーゼ及びその生産方法並びに該中性フェノールオキシダーゼに対する抗体に関する。本発明の中性フェノールオキシダーゼは、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0 ~ 12.0 で培養することによって得ることができる。本発明によれば、繊維や毛髪の色等を可能とし、さらには、環境、人体等への影響を低減させることができる。

WO 2004/078958 A1



KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

中性フェノールオキシダーゼ

技術分野

本発明は、種々の基質に対して、基質による至適pHの変動が小さく、中性付近で高い酵素活性を有する中性フェノールオキシダーゼ及びその生産方法並びに該中性フェノールオキシダーゼに対する抗体に関する。より詳しくは、繊維や毛髪の色染等に有用な中性フェノールオキシダーゼ及びその生産方法、並びに該中性フェノールオキシダーゼを特異的に認識する抗体に関する。

背景技術

フェノール化合物、ポリフェノール化合物等の種々の基質に対して酸化作用を有する酸化酵素は、主に、ペルオキシダーゼとフェノールオキシダーゼとの2つのグループに分類される。

前記ペルオキシダーゼは、種々の基質の酸化を触媒し、共通の基質として、反応系中に過酸化水素の存在を必要とする。一方、フェノールオキシダーゼは、種々の基質の酸化を触媒し、共通の基質として、分子状酸素の存在を必要とする。

したがって、既知の酸化酵素類の中でも、前記フェノールオキシダーゼは、大気中の酸素の存在下で種々の基質の酸化を触媒することができるため、酸素存在下で中間体としてのラジカル種の生成に起因する発色、脱色、重合、分解等の多様な化学反応に適している。

それゆえ、臨床分析、バイオセンサー、パルプ及び繊維の漂白、合成板の製造、木質の改善、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、接着剤の製造、有機化合物の合成、染色及び抜染、洗濯時の色移り防止、廃液中のフェノール及びアニリン化合物の除去、

毒性化合物の解毒、内分泌攪乱物質の分解、ジュースの混濁防止、食品の苦渋味の除去、家畜飼料の体内消化の促進、悪臭の抑制、化石燃料の脱硫、有害環境物質の分解処理等の多方面へのフェノールオキシダーゼの幅広い応用が期待されている。

また、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、2, 2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (以下、ABTSと略す)、1-ニトロソ-2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸 (以下、NNSと略す) 等のメディエーターを用いて反応を行なうことにより、従来触媒されにくかった (あるいは、触媒されなかった) 反応をも効率よく行なうこともできる [国際公開第96/16165号パンフレット]。

例えば、メディエーターとしてフェノチアジン-10-プロピオン酸を用いた場合、フェノールオキシダーゼによるインジゴの分解反応を効率よく行なうことができることが知られている。また、フェノールオキシダーゼ含有物と、フェノールオキシダーゼ・メディエーターを含有する組成物とを併用することにより、ダイオキシンの分解を行なうことができることが開示されている [特開2001-037465号公報]。

多くの潜在的な工業的利用については、反応効率等の観点から、反応pHは中性及びアルカリ性領域が適しており、特に中性での利用は、環境や人体等に対する影響が少ない温和な条件下での反応が可能である等の、数多くの利点を有する。

前記フェノールオキシダーゼとしては、ラッカーゼ、チロシナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ (カテコールオキシダーゼ) アスコルビン酸オキシダーゼ、又はピリルビンオキシダーゼ等が挙げられる。

ただし、チロシナーゼは、モノフェノール化合物、及び、オルト-ジフェノール化合物の直接的な酸化 (発色) を触媒するが、パラ-ジフェノール化合物及びパラ-ジアミン (フェニレンジアミン) 化合物の酸化を触媒しないという特徴がある [メイヤー (Mayer) 及びハレル (Harel), *Phytochem.* 18, 193-215, 1979]。

前記フェノールオキシダーゼは、従来から種々の植物、細菌類及び真菌類等に見出されている。例えば、植物では、ウルシ科 (*Anacardiaceae*) の分泌性導管、桃類、栗類、マキ科 (*Podocarpaceae*) 等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている。真菌類では、不完全菌亜門 (*Deuteromycotina*) に属する、アスペルギルス (*Aspergillus*)、ボトリティス (*Botrytis*)、ミロセシウム (*Myrothecium*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、ペスタロチア (*Pestalotia*)、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 等；担子菌亜門 (*Basidiomycotina*) に属する、プロイロータス (*Pleurotus*)、レンティナス (*Lentinus*)、ポリポラス (*Polyporus*)、トラメテス (*Trametes*)、コリオラス (*Coriolus*) 等；子囊菌亜門 (*Ascomycotina*) に属するポドスポラ (*Podospora*)、ノイロスポラ (*Neurospora*)、モノシリウム (*Monocillium*) 等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている。細菌では、バチルス (*Bacillus*)、アゾスピリウム (*Azospirillum*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、アエロバクタ (*Aerobacter*) 等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている [ヨシダ (Yoshida), J. Chem. Soc. 43, 472, 1883]。

これらの中で、担子菌 (*Basidiomycetes*) (木材腐朽菌類等、中でも白色腐朽菌等) であるキノコでは、例えば、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)、ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、ベッコウタケ (*Fomitella fraxinea*) 等において、前記フェノールオキシダーゼが見出されている [ウラー (Ullah) 及びエバンス (Evans), Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 230-

234, 2000}。

しかし、フェノールオキシダーゼの多くは、種々の基質に対する酵素活性の至適pHを酸性側に有し、使用用途が限定されるという欠点がある。また、中性やアルカリ性に至適pHを有するフェノールオキシダーゼでも、用いる基質によって至適pHが大きく変動し、中性付近で種々の基質に対して効率よく作用しないという欠点がある。

また、イルペックス・ラクテウス (*Irpex lacteus*)、オウリキュリア・ポリトリカ (*Auricularia polytricha*)、ガノデルム・ルシダム (*Ganoderma lucidum*)、コプリナス・ミカセウス (*Coprinus micaceus*)、ダエダレオプシス・スチラシナ (*Daedaleopsis styracina*) 及びフラムリナ ベルティペス (*Flammulina velטיפες*) には、ラッカーゼが見出されており、なかでも、イルペックス・ラクテウス (*Irpex lacteus*) のラッカーゼは、pH6.0付近の反応条件下に、4-アミノアンチピリンとフェノールとを酸化縮合して発色する活性を示すことが見出されている (特開昭60-156385号公報)。

しかしながら、前記ラッカーゼは、酸性条件で培養することにより見出される酵素である。

発明の開示

本発明は、繊維や毛髪の色を可能にし、さらには、環境、人体等への影響を低減させることができる手段を提供することを目的とする。本発明は、種々の化合物、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物に対して中性付近に至適pHを有すること、中性pHから弱アルカリ性pHまでの広範囲で高い安定性を示すこと、基質による至適pHの変動が小さいこと等の特性を有するフェノールオキシダー

ぜ、具体的には、中性フェノールオキシダーゼを提供することを目的とする。また、本発明は、前記中性フェノールオキシダーゼを、効率よく、簡便に、安価に、かつ大量に得ることができる、生産方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、前記中性フェノールオキシダーゼの回収、精製等を可能にする抗体を提供することを目的とする。また、本発明は、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミン化合物等による染色が可能な染色方法及び取扱いが簡便である染色用組成物を提供することを目的とする。

すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 以下の特性：

(1) 至適pH：5.0～7.0

(2) 基質特異性

i) N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応をpH6.5付近で触媒する

i i) リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する
を有する中性フェノールオキシダーゼ、

〔2〕 下記(3)～(7)：

(3) 28kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4) pH安定性：pH8.0～9.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5) 至適温度：30～50℃

(6) 熱安定性：

1) 0℃～30℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、イ

ンキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II) 0℃～30℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7) 等電点：約7.4

の特性、又は

下記(3')～(7'):

(3') 35 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4') pH安定性：pH7.0～10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも75%の相対残存活性を維持する

(5') 至適温度：30～60℃

(6') 熱安定性：

I') 0℃～50℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

II') 0℃～50℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を有する

(7') 等電点：約6.8

の特性、又は

下記(3'')～(7''):

(3'') 45 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4'') pH安定性：pH8.0～10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5'') 至適温度：30～60℃

(6'') 熱安定性：

I'') 0℃～30℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、

インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II'') 0℃～40℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7'') 等電点：約6.8

の特性

をさらに有する、前記〔1〕記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔3〕 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が生産する、前記〔1〕又は〔2〕記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔4〕 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が、エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌である、前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔5〕 エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌が、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕 IFO30601株である、前記〔1〕～〔4〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼ、

〔6〕 フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH6.0～12.0で培養することを特徴とする、中性フェノールオキシダーゼの生産方法、

〔7〕 中性フェノールオキシダーゼが、前記〔1〕又は〔2〕記載の中性フェノールオキシダーゼである、前記〔6〕記載の生産方法、

〔8〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼに対する抗体、

〔9〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼを含有してなる染色用組成物、

〔10〕 染料をさらに含有してなる、前記〔9〕記載の染色用組成物、並びに

〔11〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼの存在下に、染色対象物と染料とを接触させて、該染色対象物を染色することを特徴とする、染色方法、
に関する。

図面の簡単な説明

図1は、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601株のDEAE-セルロース溶出画分の活性染色の結果を示す。図中、レーン1は、パラフェニレンジアミンを用いた活性染色の結果、レーン2は、2,6-ジメトキシフェノールを用いた活性染色の結果、レーン3は、オルト-アミノフェノールを用いた活性染色の結果をそれぞれ示す。

図2は、イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図2中、菱形は、280nmにおける吸光度 (A_{280}) に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、三角は、400nmにおける吸光度 (A_{400}) に基づく、各フラクション中の糖質量の変化を示し、四角は、470nmにおける吸光度 (A_{470}) に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示し、十字は、塩化ナトリウム濃度 (M) を示す。

図3は、中性フェノールオキシダーゼIのゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図3中、菱形は、280nmにおける吸光度 (A_{280}) に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470nmにおける吸光度 (A_{470}) に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示す。

図4は、中性フェノールオキシダーゼIIのゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図3中、菱形は、280nmにおける吸光度 (A_{280}) に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470nmにおける吸光度 (A_{470}) に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示す。

図5は、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼI Iの精製スキームを示す。

図6は、中性フェノールオキシダーゼI I Iのイオン交換クロマトグラフィー（DEAEセルロース）のクロマトグラムを示す。図6中、菱形は、280nmにおける吸光度（A280）に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470nmにおける吸光度（A470）に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示し、直線は、塩化ナトリウム濃度（M）を示す。

図7は、中性フェノールオキシダーゼI I Iのイオン交換クロマトグラフィー（Qセファロース）のクロマトグラムを示す。図7中、菱形は、280nmにおける吸光度（A280）に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470nmにおける吸光度（A470）に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示し、直線は、塩化ナトリウム濃度（M）を示す。

図8は、中性フェノールオキシダーゼI I Iの精製スキームを示す。

図9は、中性フェノールオキシダーゼI I Iのゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。図9中、菱形は、280nmにおける吸光度（A280）に基づく、各画分中のタンパク質量の変化を示し、四角は、470nmにおける吸光度（A470）に基づく、各画分中の酵素活性の変化を示す。

図10は、中性フェノールオキシダーゼIの至適pHの結果を示す。図10において、最大活性を100とした場合の相対活性で示す。また、図10において、パネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネルCは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネルDは、シリングアルダジンを基質とした場合を示す。

図11は、中性フェノールオキシダーゼI Iの至適pHの結果を示す。図11において、最大活性を100とした場合の相対活性で示す。また、図11において、パネルA

は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネルCは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネルDは、シリンガルダジンを基質とした場合を示す。

図12は、中性フェノールオキシダーゼI I Iの至適pHの結果を示す。図12において、最大活性を100とした場合の相対活性で示す。また、図12において、パネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネルCは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネルDは、シリンガルダジンを基質とした場合を示す。

図13は、中性フェノールオキシダーゼIのpH安定性の結果を示す。なお、図13において、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図13中、パネルA及びBは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルC及びDは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図13中、パネルA及びCは、1時間後のpH安定性を示し、パネルB及びDは、20時間後のpH安定性を示す。

図14は、中性フェノールオキシダーゼI IのpH安定性の結果を示す。なお、図14において、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図14中、パネルA及びBは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルC及びDは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図14中、パネルA及びCは、1時間後のpH安定性を示し、パネルB及びDは、20時間後のpH安定性を示す。

図15は、中性フェノールオキシダーゼI I IのpH安定性の結果を示す。なお、図15において、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図15中、パネルA及びBは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルC及びDは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図15中、パネルA

及びCは、1時間後のpH安定性を示し、パネルB及びDは、20時間後のpH安定性を示す。

図16は、中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII、及び中性フェノールオキシダーゼIIIの等電点電気泳動の結果を示す。

図17は、中性フェノールオキシダーゼIの至適温度の結果を示す。なお、図17において、最大活性を100とした相対活性で示す。また、図17中、パネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

図18は、中性フェノールオキシダーゼIIの至適温度の結果を示す。なお、図18において、最大活性を100とした相対活性で示す。また、図18中、パネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

図19は、中性フェノールオキシダーゼIIIの至適温度の結果を示す。なお、図19において、最大活性を100とした相対活性で示す。また、図19中、パネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

図20は、中性フェノールオキシダーゼIの熱安定性の結果を示す。なお、図20において、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図20中、パネルA及びBは、pH7.0における熱安定性を示し、パネルC及びDは、pH9.0における熱安定性を示す。さらに、図20中、パネルA及びCは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルB及びDは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

図21は、中性フェノールオキシダーゼIIの熱安定性の結果を示す。なお、図21において、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図21中、パネルA及

びBは、pH 7.0における熱安定性を示し、パネルC及びDは、pH 9.0における熱安定性を示す。さらに、図21中、パネルA及びCは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルB及びDは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

図22は、中性フェノールオキシダーゼIIIの熱安定性の結果を示す。なお、図22において、インキュベーション前の酵素活性を100とした場合の、相対残存活性で示す。また、図22中、パネルA及びBは、pH 7.0における熱安定性を示し、パネルC及びDは、pH 9.0における熱安定性を示す。さらに、図22中、パネルAおよびCは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルB及びDは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、以下の特性：

(1) 至適pH：5.0～7.0

(2) 基質特異性

i) N,N-ジメチル-パラフェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、1,3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応をpH 6.5付近で触媒する

ii) リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する
を有するフェノールオキシダーゼである。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、基質の種類による至適pHの変動が小さいという優れた性質を有する。したがって、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、多基質に対し、実質的に同一の反応pH条件での反応を行なうことができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、複数の

化合物を基質として用いる場合でも、反応pH条件の変更の工程を簡略化させることができるという優れた効果を発揮する。したがって、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、繊維や毛髪の染色等に用いることにより、反応pH条件の変更の工程を簡略化することができる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、より具体的には、前記(1)及び(2)の特性に加え、下記(3)～(7)：

(3) 28 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4) pH安定性：pH 8.0～9.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5) 至適温度：30～50℃

(6) 熱安定性：

I) 0℃～30℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II) 0℃～30℃において、pH 9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7) 等電点：約7.4

の特性、又は

下記(3')～(7')：

(3') 35 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4') pH安定性：pH 7.0～10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも75%の相対残存活性を維持する

(5') 至適温度：30～60℃

(6') 熱安定性：

I') 0℃～50℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、

インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

II') 0℃～50℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を有する

(7') 等電点：約6.8

の特性、又は

下記(3'')～(7''):

(3'') 45kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4'') pH安定性：pH8.0～10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5'') 至適温度：30～60℃

(6'') 熱安定性：

I'') 0℃～30℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II'') 0℃～40℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7'') 等電点：約6.8

の特性

をさらに有する、中性フェノールオキシダーゼである。なお、本明細書においては、前記(1)及び(2)と(3)～(7)との特性を有する中性フェノールオキシダーゼを、

「中性フェノールオキシダーゼI」といい、前記(1)及び(2)と(3')～(7')との特性を有する中性フェノールオキシダーゼを「中性フェノールオキシダーゼII」といい、前記(1)及び(2')と(3'')～(7'')との特性を有する中性フェノールオキシダーゼを「中性フェノールオキシダーゼIII」という。

本明細書において、「フェノールオキシダーゼ」とは、酸素存在下で、フェノール化

合物、アミノフェノール化合物、ジアミン化合物、複素環化合物等を基質として、触媒的に直接酸化する酸化酵素をいう。より具体的には、前記「フェノールオキシダーゼ」とは、パラフェニレンジアミン、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、ABTS、シリングアルダジンを直接酸化するが、L-チロシンを直接酸化しないフェノールオキシダーゼをいう。

また、本明細書において、「中性フェノールオキシダーゼ」とは、至適pH 5. 0～7. 0、好ましくは、至適pH 5. 5～7. 0のフェノールオキシダーゼをいう。

前記フェノール化合物としては、例えば、2-メトキシフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、ピロガロール、没食子酸、没食子酸プロピル、1-ナフトール、カテキン等が挙げられる。また、前記アミノフェノール化合物としては、例えば、オルト-アミノフェノール、パラ-アミノフェノール等が挙げられる。さらに、前記ジアミン化合物としては、例えば、オルト-フェニレンジアミン、パラ-フェニレンジアミン等が挙げられる。前記複素環化合物としては、4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール等が挙げられる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼの酵素活性は、基質に対する酸化活性、染料に対する脱色活性等を測定することにより評価されうる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼによる基質に対する酸化活性は、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミン化合物等を水素供与体として用いて酸素分子を還元する、基質の直接的な酸化反応を測定することによって求められうる。水素供与体としては、例えば、2, 6-ジメトキシフェノール、オルト-アミノフェノール、パラフェニレンジアミン等を挙げることができる。前記酸化活性は、例えば、シリングアルダジン (530 nm)、2, 6-ジメトキシフェノール及びパラフェニレンジアミン (470 nm)、オルト-アミノフェノール (420 nm) における吸光度の変化により測定される。

具体的には、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.896 ml に、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml を添加し、基質溶液を得る。この基質溶液と中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の酵素溶液 0.004 ml とを混合して、2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応を開始させる。ついで、この2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応を、470 nmにおける吸光度の変化により測定することによって、前記酸化活性を求められうる。前記酸化活性は、各基質に応じた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位 (U: ユニット) として定義される。

また、本発明の中性フェノールオキシダーゼによる染料に対する脱色活性は、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の存在下、染料の吸収スペクトルの極大値 (λ_{\max}) の減少を測定することによって求められうる。前記染料としては、例えば、アシッドバイオレッド17、エバンスブルー、アシッドブルー80等を挙げることができる。染料の脱色活性は、例えば、アシッドバイオレッド17 (550 nm)、エバンスブルー及びアシッドブルー80 (630 nm) における吸光度の減少により測定される。

具体的には、アシッドバイオレッド17を用いる場合、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を含む酵素溶液 0.8 ml に、1.0 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.1 ml を添加し、ついで、0.2 mg/ml のアシッドバイオレッド17水溶液 0.1 ml を混合して、得られた混合液について、550 nmにおける吸光度の減少を測定することによって、脱色活性を求められうる。なお、前記脱色反応に関する酵素活性は、各染料に応じた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位 (U: ユニット) として定義される。

本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、ゲル濾過法により算出した場合、いずれも約72 k

D a の分子量、S D S - P A G E により算出した場合、中性フェノールオキシダーゼ I は、2 8 k D a の分子量、中性フェノールオキシダーゼ I I は、3 5 k D a の分子量を有する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I I I は、ゲル濾過法により算出した場合、約 4 5 k D a の分子量について、S D S - P A G E により算出した場合、4 5 k D a の分子量を有する。本明細書において、前記分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたゲル濾過法又は S D S - P A G E 法により算出された値をいう。前記分子量は、例えば、目的のタンパク質を、ゲル濾過クロマトグラフィーに供して、一定流速の下での溶出液量を測定し、得られた測定値又は S D S - P A G E 法に供して、移動度を測定し、得られた測定値と、分子量が既知である分子量マーカーを用いて作成された検量線とを比較することにより算出されうる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、いずれも p H 5. 0 ~ 7. 0 の範囲で、高い酵素活性を有し、かかる p H の範囲において、最大活性に対して、少なくとも 5 0 % の相対活性を示す。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、前記 p H 範囲で優れた酵素活性を示すため、水ベースの反応溶液を用いることができ、効率よく酵素反応を行なうために特別な p H 調整が必要とされないという優れた効果を発揮する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼは、水ベースの反応溶液を用いることができ、具体的には、例えば、特別な p H 調整を行っていない基質と酵素との水溶液でも効率よく反応を行なうことができるため、反応溶液による人体、環境への影響が少ないという優れた効果を発揮する。さらに、本発明の中性フェノールオキシダーゼは、種々の基質、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物のいずれに対しても至適 p H に大きな変動がなく、中性付近の p H で効率よく基質を酸化させることができる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、具体的には、フェノール化合物、アミノフ

エノール化合物及びジアミン化合物を基質とする酸化反応において、中性付近、具体的には、pH 5.0～7.0、好ましくは、pH 5.5～7.0に至適pHを有する。

より具体的には、中性フェノールオキシダーゼIは、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.0～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約7.0であり、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5であり、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5であり、さらに至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、シリンガルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5、特に、約6.5である。一方、中性フェノールオキシダーゼIIは、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.0～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約7.0、さらに至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5、さらに至適な範囲として、約5.5～約6.0であり、シリンガルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5～約7.0、より至適な範囲として、約5.5～約6.5である。また、中性フェノールオキシダーゼIIIは、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.0～約7.0、より至適な範囲として約5.5であり、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.0～7.0であり、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.0～7.0、より至適な範囲として、約5.0～6.0であり、シリンガルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.0～7.0であり、より至適な範

囲として、約 6.0 である。

本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III は、いずれも、

i) N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び 4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応を pH 6.5 付近で触媒する

ii) リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する

という基質特異性を示す。具体的には、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、いずれも、中性 (pH 6.5) 条件下で、下記基質特異性：

- 1) オルト-フェニレンジアミン、パラ-フェニレンジアミン、N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、トリレン-3, 4-ジアミン、パラ-アミノジフェニルアミン、2-クロロ-1, 4-フェニレンジアミン、2, 5-ジアミノトルエン等のジアミン化合物の酸化反応を触媒し、特に、N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒する
- 2) オルト-アミノフェノール、パラアミノフェノール、5-アミノ-2-メチルフェノール等のアミノフェノール化合物の酸化反応を触媒し、特に、オルト-アミノフェノールの酸化反応を強く触媒する
- 3) 2-メトキシフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、プロトカテク酸等のフェノール化合物の酸化反応を触媒し、特に、2, 6-ジメトキシフェノールの酸化反応を強く触媒する
- 4) 1-ナフトール、1, 3-ジヒドロキシナフトール、1, 5-ジヒドロキシナフトール等のナフトール化合物の酸化反応を触媒し、特に、1, 3-ジヒドロキシナフトールの酸化反応を強く触媒する

5) 4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール等のインドール化合物の酸化反応を触媒する

6) カテキン（緑茶抽出物）、リグニンアルカリ抽出物（稲由来）、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹由来）等の化合物（抽出物）の酸化反応を触媒する

を示す。なお、前記基質特異性に関して、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I は、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹由来）を基質とした場合、中性（pH 6.5）条件及びアルカリ性（pH 9.0）条件の両方で同等の強い触媒活性がみられ、その他のジアミン化合物、アミノフェノール化合物、フェノール化合物、ナフトール化合物、インドール化合物、カテキン（緑茶抽出物）及びリグニンアルカリ抽出物（稲由来）のそれぞれを基質とした場合、中性（pH 6.5）条件下での比活性のほうが、アルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性よりも高いという特性を有する。一方、本発明の中性フェノールオキシダーゼ II は、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹）を基質とした場合以外は、様々な基質において、中性（pH 6.5）条件下での比活性のほうが、アルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性よりも高いという特性を有する。また、中性フェノールオキシダーゼ III は、様々な基質に対して、中性（pH 6.5）条件下での比活性のほうが、アルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性よりも高いという特性を有する。

また、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III は、いずれも、フェノールオキシダーゼ・メディエーターである ABTS、NNS を基質として酸化する。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、中性 pH から弱アルカリ性 pH までの広範囲で高い pH 安定性を示すという優れた性質を有する。具体的には、中性フェノールオキシダーゼ I は、pH 7.0～10.0 において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも25%の相対残存活性、好ましくは、pH 8.0～9.0 において、30℃で20時間のインキュベーション条

件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する。一方、中性フェノールオキシダーゼIIは、pH4.0~10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも50%の相対残存活性、pH7.0~10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも75%の相対残存活性を維持する。また、中性フェノールオキシダーゼIIIは、pH7.0~11.5において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、最大活性に対し、少なくとも30%以上の相対残存活性、好ましくは、pH8.0~10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、最大活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持する。

本発明の中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIは、それぞれ、30~50℃の範囲、30~60℃の範囲及び30~60℃の範囲で、高い酵素活性を示す。すなわち、本発明の中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIは、前記温度範囲において優れた酵素活性を有するため、特別な温度条件に調整することなく、日常の生活温度（室温、水温、体温、気温等）で高い酵素活性を示す。したがって、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、染色、廃液処理、高分子化合物の合成等を簡便に行なうことができる。具体的には、本発明の中性フェノールオキシダーゼIは、

I) 0℃~40℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも50%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃~30℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II) 0℃~40℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、イ

ンキュベーション前の活性に対し、少なくとも50%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃～30℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持するという熱安定性を示す。一方、本発明の中性フェノールオキシダーゼIIは、

I') 0℃～60℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも15%の相対残存活性を維持し、0℃～50℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

II') 0℃～50℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃～40℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持するという熱安定性を示す。

また、中性フェノールオキシダーゼIIIは、

I'') 0℃～50℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも50%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃～30℃において、pH7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%以上の相対残存活性を維持する

II'') 0℃～50℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも40%の相対残存活性を維持し、好ましくは、0℃～40℃において、pH9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持するという熱安定性を示す。

本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼI、中性フ

エノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、具体的には、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌により生産される。前記フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌としては、具体的には、エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌が挙げられ、より具体的には、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕 IFO30601 株が挙げられる。本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、特に、前記エノキタケより得ることができるため、供給源の入手が容易であり、取扱いの容易性にも優れる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を培養することによって生産することができる。かかる中性フェノールオキシダーゼの生産方法も本発明に含まれる。

本発明の生産方法は、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0 で培養することを 1 つの特徴とする。

本発明の生産方法においては、担子菌を pH 6.0～12.0 で培養するため、本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼ I、フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I が誘導され、驚くべく効率よくかつ高い収率で本発明の中性フェノールオキシダーゼをえることができるという優れた効果を発揮する。

本発明の生産方法としては、具体的には、1) フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0 で培養する工程、及び
2) 前記工程 1) で得られた培養物の培養液上清又は該培養物より得られた抽出物から中性フェノールオキシダーゼを分離する工程、

を含む方法が挙げられる。

前記培地のpHは、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を十分に生育させ、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III を生産するに適した pH であればよく、pH 6.0 ~ 12.0、好ましくは、pH 7.0 ~ 11.0、更に好ましくは pH 8.0 ~ 10.0 に調製し、滅菌して使用することが望ましい。

なお、本発明においては、中性フェノールオキシダーゼの生産量を向上させる観点から、前記工程 1) において、

i) 担子菌の菌糸体を増やすための培養工程、及び

ii) 前記培養工程 i) で得られた菌糸体中において、酵素の発現を誘導して生産量を増やすための培養工程

を行なってもよい。この場合、前記培養工程 i) において、菌糸体の増殖に適した pH、具体的には、例えば、pH 2.0 ~ 13.0、好ましくは、pH 4.0 ~ 10.0、特に好ましくは、pH 5.2 での培養を行ない、ついで、前記培養工程 ii) において、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を生産するに適した pH、具体的には、pH 6.0 ~ 12.0、好ましくは、pH 7.0 ~ 11.0、更に好ましくは pH 8.0 ~ 10.0 での培養を行なってもよい。また、前記培養工程 i) においては、菌糸体の培養量をスケールアップする操作を適宜行なってもよい。

前記工程 1) において、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌は、液体培養、又は固体培養のいずれにおいても培養することができる。

フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌の培養には、この菌が生育可能な、通常の液体培地又は固体培地のいずれを用いてもよい。

なお、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を液体培養する場合は、

通気培養又は振盪培養が望ましい。

炭素源としては、例えば、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が同化しうるものであれば何でもよく、グルコース、ショ糖、糖蜜、でんぷん等の糖類、ふすま、みかんパルプ等が挙げられ、前記炭素源は、単独で、又は、2種類以上を組み合わせる用いることができる。また、窒素源としては、例えば、おから、ペプトン、トリプトン、カザミノ酸、酵母エキス、麦芽エキス、脱脂大豆粉、コーンステープリカー、尿素等の有機窒素源のほか、硝酸カリウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素等も挙げられ、単独で、又は、2種類以上を組み合わせる用いることができる。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II を生産するための培地には、必要に応じて、リン酸塩、硫酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、カリウム、カルシウム、鉄、銅、亜鉛、マンガン、コバルト等の無機塩類、ビタミン類等を添加してもよい。これらの培地中における前記炭素源、窒素源等の濃度は、フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を十分に生育させ、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III それぞれを生産するに適した濃度であればよく、炭素源は 0.1 ~ 20 重量%、好ましくは 1 ~ 10 重量%、窒素源は 0.1 ~ 10 重量%、好ましくは 1 ~ 5 重量%である事が望ましい。

培養温度は、糸状菌が生育する温度であればよく、実用上、10 ~ 40℃、好ましくは 20 ~ 35℃であることが望ましい。

培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通気培養の場合は、通常 2 ~ 10 日間が望ましい。また、前記培養時間は、培養液の酵素活性値が最大になることを指標として、設定することもできる。

前記工程 1) の具体例としては、例えば、

ー フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、液体培養用培地 1 (組

成：2.4重量% ポテトデキストロースプロス〔ディフィコ (D i f c o) 社製〕、
残部 水 (pH 5.2)；121℃で15分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で7
日間、往復振盪培養(150往復/分)を行ない、得られた培養液全量を、2L容の三
角フラスコ中500mlの前記液体培養用培地1に添加し、25℃で3週間、往復振盪
培養(100往復/分)を行なう工程(前記培養工程 i)に対応)、及び

ー 得られたペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、上清の培養液を除去し、残部の菌糸
体に、液体培養用培地2〔組成：1.0重量% グルコース、0.1重量% 酵母エキ
ス、0.14重量% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.36重量% K_2HPO_4 、0.02重量%
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.10重量% ミネラル混合液(組成：1.0重量% Cu
 $\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.0重量% ZnCl_2 、0.7重量% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.
5重量% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、pH 9.2；1
21℃で15分間滅菌したもの〕500mlを添加し、さらに25℃で3日間培養す
る工程(前記培養工程 i i)に対応)

を行なうこと等が挙げられる。

ついで、前記工程1)で得られた培養物の培養液上清又は該培養物より得られた抽出
物から中性フェノールオキシダーゼを分離する工程〔工程2)〕を行なう。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、菌体外に分泌生産され、培養液中に蓄積さ
れる。したがって、前記工程2)において、前記工程1)で得られた培養物から、菌体
等の不溶物を遠心分離、濾紙又は濾布等による濾過等により除去し、本発明の中性フェ
ノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I を包含する培養上清を得
ることができる。

また、前記工程2)において、フラムリナ (F l a m m u l i n a) 属に属する担子
菌の菌床、又は栽培後の廃菌床から抽出し、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、
中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれを

包含する抽出物を得ることもできる。

得られた培養上清又は抽出物を、脱色、濃縮、塩析（例えば、硫酸分画）、透析、各種クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の一般に用いられるタンパク質の精製法に供することにより、中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III を分離精製することができる。

例えば、得られた培養上清又は抽出物を凍結乾燥し、再度溶解させ、得られた産物を濾過することによって不溶物を取り除き、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等に順次供試することにより、精製され、かつ高い比活性を有する本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III を含有する画分が得られる。

具体的には、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II は、例えば、

- ー 得られた培養液の pH を 7.5 に調整し、pH 調整後の培養液 1 L に対して、5 g（乾燥重量）の DEAE セルロース〔シグマ（Sigma）社製〕担体を添加して、タンパク質を吸着させ、
- ー 該担体に吸着したタンパク質を、3 倍容量の 1 M 塩化ナトリウムを含有した 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）で溶出させ、得られたタンパク質溶液を凍結乾燥させ
- ー 得られた凍結乾燥物を 0.05 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解させ、
- ー 得られた溶液を、0.05 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化された商品名：Q セファロースカラム〔2.6×10 cm、ファルマシア（Pharmacia）社製〕に供し、0～1 M 塩化ナトリウムによる勾配溶出法で中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II それぞれを溶出し、それぞれ凍結乾燥させ、

ー 得られた凍結乾燥物を、0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させ、

ー 得られた産物を、0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名：セファクリル S-100 HRカラム〔1.6 × 60 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供し、0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて、溶出を行なうこと

により、得られうる。

一方、中性フェノールオキシダーゼ III は、例えば、

ー 前記培養液を濃縮し、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して4℃で一晩透析し

ー 得られた濾液を、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したDEAE-セルロースカラム〔シグマ (Sigma) 社製、2.6 × 60 cm〕に供し、

ー 0 ~ 1 M 塩化ナトリウムによる勾配溶出法で、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼ III を溶出し、

ー 得られた画分を、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して4℃で一晩透析し、

ー 得られた溶液を、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化された商品名：Q-セファロースカラム〔2.6 × 10 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供し、0.2 ~ 0.5 M 塩化ナトリウムによる勾配溶出法で中性フェノールオキシダーゼ III を溶出し、

ー 得られた画分を、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して4℃、3時間透析し、

ー 得られた溶液を、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したDEAE-セルロースカラム〔シグマ (Sigma) 社製、 1.5×5.5 cm〕に供し、1M 塩化ナトリウムを含む0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で、中性フェノールオキシダーゼIIIを溶出させることにより得られうる。

本発明において、中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIの精製度は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-PAGE)、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 及びこれらの電気泳動後のゲルを用いた活性染色により評価されうる。

本発明において、前記native-PAGE及びSDS-PAGEの際、共に、泳動用サンプルを加熱せずに電気泳動を行なう。

native-PAGEを行なった後に、パラフェニレンジアミンを基質として用いる活性染色を行なう場合、例えば、native-PAGE後に得られたゲルを、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で20分間振盪攪拌し、その後、0.001M パラフェニレンジアミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で5分間振盪攪拌することによって行なえばよい。

native-PAGEを行なった後、クーマシーブリリアントブルーによりタンパク質の染色を行なう場合、例えば、0.5gのクーマシーブリリアントブルー R250を、500mlのメタノールと100mlの酢酸との混合溶液 (全600ml) に溶解し、蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた染色用溶液に、電気泳動後のゲルを浸すことにより染色を行なえばよい。その後、250mlのメタノールと70mlの酢酸との混合溶液 (320ml) を蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた脱色用溶液で、脱色を行なう。

SDS-PAGEを行なった後、パラフェニレンジアミンにより活性染色を行なう

場合、例えば、SDS-PAGE後に得られたゲルを、2.5w/v% Triton X-100を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で60分間振盪攪拌し、その後、0.001M パラーフェニレンジアミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中でゲルを5分間振盪攪拌することによって行なえばよい。

SDS-PAGEを行なった後、クーマシーブリリアントブルーによるタンパク質の染色を行なう場合、例えば、0.5gのクーマシーブリリアントブルーR250を、500mlのメタノールと100mlの酢酸との混合溶液(全600ml)に溶解し、蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた染色用溶液に、電気泳動後のゲルを浸すことにより染色を行なえばよい。その後、250mlのメタノールと70mlの酢酸との混合溶液(320ml)を蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整して得られた脱色用溶液で、脱色を行なう。

本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIは、SDS-PAGE後のクーマシーブリリアントブルー染色による純度の評価において、それぞれ実質的に均一な精製度を示すため、本発明により、該中性フェノールオキシダーゼに対する抗体も提供される。

本発明の抗体は、本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIに特異的に結合する能力を有するものであればよく、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよい。

本発明の抗体は、本発明の中性フェノールオキシダーゼである中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIのそれぞれについて、例えば、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー [Curr

ent Protocols in Immunology、ジョン・E・コリガン(John E. Coligan)編集、1992年、ジョン・ワイリー&サンズ社(John Wiley & Sons, Inc.)発行]等に記載の方法にしたがい、ウサギ、マウス等の動物を免疫し、慣用の方法で精製することにより、容易に作製されうる。

また、本発明においては、本発明の中性フェノールオキシダーゼに結合するものであれば、前記モノクローナル抗体の一部、すなわち、抗体断片であってもよい。前記抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv等が挙げられる。かかる抗体断片は、例えば、ペプチダーゼ等により、モノクローナル抗体を消化することにより得られうる。例えば、Fabフラグメントは、前記モノクローナル抗体をパパインにより処理することにより得られ、F(ab')₂フラグメントは、前記モノクローナル抗体をペプシンにより処理することにより得られうる。

本発明の抗体は、例えば、本発明の中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれに対する結合性、親和性等について、ELISA法、Ouchterlony法、免疫電気泳動法等により測定することにより評価されうる。

本発明の抗体は、本発明の中性フェノールオキシダーゼの精製のためのアフィニティークロマトグラフィー、該中性フェノールオキシダーゼのスクリーニング等に用いることができる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、種々の染料、色素等と共に用いることにより、ケラチン繊維等の染色を行なうことができる。したがって、本発明により、染色方法及び染色用組成物が提供される。

また、本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、該中性フェノールオキシダーゼの存在下で、染色対象物と染料とを接触させることにより、染色を行なうことができる。本発明の中性フェノールオキシダーゼによれば、繊維や毛髪の染色等において、特

別な温度条件、pH条件に調整することなく、外界環境条件下において行なうことができ、人体、環境等への影響を低減させることができるという優れた効果を発揮する。

本発明の染色方法を適用しうる染色対象物としては、例えば、綿、ジアセテート、亜麻、リンネル、リオセル、ポリアクリル、ポリアミド、ポリエステル、ラミー、レーエン、テンセル、トリアセテート、毛皮、獣皮、皮革、絹又はウール製の布帛、糸、繊維、衣料、フィルム、木材、毛髪等が挙げられる。

前記染料としては、医薬部外品原料規格に収載されている酸化染料やインドリン及びインドール化合物等が挙げられ、かかる染料は、単独又は複数を組み合わせて用いることができる。また、カップリング剤を用いることもできる。また、直接染料も用いられる。

インドリン及びインドリン化合物としては、具体的には、インドリン、5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-エチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-ブチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、4-ヒドロキシ-5-メトキシインドリン、6-ヒドロキシ-7-メトキシインドリン、6, 7-ジヒドロキシインドリン、4, 5-ジヒドロキシインドリン、4-メトキシ-6-ヒドロキシインドリン、N-ヘキシル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、2-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、3-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、4-ヒドロキシインドリン、2, 3-ジメチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、2-メチル-5-エチル-6-ヒドロキシインドリン、2-メチル-5-ヒドロキシ-6-β-ヒドロキシエチルインドリン、4-ヒドロキシプロピルインドリン、2-ヒドロキシ-3-メトキシインドリン、6-ヒドロキシ-5-メトキシインドリン、6-ヒドロキシインドリン、5-ヒドロキシインドリン、7-ヒドロキシインドリン、7-アミノインドリン、5-アミノインドリン、4-アミノインドリン、5, 6-ジヒドロキシインドリンカルボン酸、1-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、並びにこれらの塩類等

を例示されうる。

インドール化合物として、具体的には、4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール、5, 6-ジヒドロキシインドール、5, 6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸、5, 6-トリ (t-ブトキシカルボニルオキシ) インドール、5, 6-ジ (t-ブトキシカルボニルオキシ) インドール、5-t-ブトキシカルボニルオキシ-6-ヒドロキシインドール、6-t-ブトキシカルボニルオキシ-5-ヒドロキシインドール、5, 6-ジ (エトキシカルボニルオキシ) インドール、5, 6-ジ (エチルカルバモイルオキシ) インドール、1-ピバロイル-5- (ピバロイルオキシメトキシ)-6-ピバロイルオキシインドール、1-ピバロイル-5-ピバロイルオキシメトキシ-6-ヒドロキシインドール、5, 6- (オキシカルボニルメトキシ) インドール等が挙げられる。

医薬部外品原料規格に収載されている酸化染料としては、具体的に、5-アミノ-*o*-クレゾール、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、*p*-アミノフェノール、2, 6-ジアミノピリジン、5- (2-ヒドロキシエチルアミノ) -2-メチルフェノール、*N*, *N*-ビス (β -ヒドロキシ) -*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*p*-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン、*p*-ニトロ-2', 4'-ジアミノアゾベンゼン・硫酸ナトリウム、トルエン-2, 5-ジアミン、5-アミノ-*o*-クレゾール・硫酸塩、*p*-アミノフェノール・硫酸塩、*o*-クロロ-*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、4, 4'-ジアミノジフェニルアミン・硫酸塩、*p*-メチルアミノフェノール・硫酸塩、*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*m*-フェニレンジアミン・硫酸塩、トルエン-2, 5-ジアミン・硫酸塩、2, 4-ジアミノフェノキシエタノール・塩酸塩、トルエン-2, 5-ジアミン・塩酸塩、*m*-フェニレンジアミン・塩酸塩、2, 4-ジアミノフェノール・塩酸塩、3, 3'-イミノジフェノール、*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン・酢

酸塩、1, 5-ジヒドロキシナフタレン、トリレン-3, 4-ジアミン、p-メチルアミノフェノール、N, N'-ビス(4-アミノフェニル)-2, 5-ジアミノ-1, 4-キノンジイミン、o-アミノフェノール・硫酸塩、2, 4-ジアミノフェノール・硫酸塩、m-アミノフェノール・硫酸塩等を例示されうる。

また、本発明においては、2-アミノ-4-ニトロフェノール、2-アミノ-5-ニトロフェノール、1-アミノ-4-メチルアミノアントラキノン、ニトロ-p-フェニレンジアミン・塩酸塩、1, 4-ジアミノアントラキノン、ニトロ-p-フェニレンジアミン、ピクラミン酸、ピクラミン酸ナトリウム、2-アミノ-5-ニトロフェノール・硫酸塩、レゾルシノール、ニトロ-p-フェニレンジアミン・硫酸塩、p-ニトロ-o-フェニレンジアミン・硫酸塩、p-ニトロ-m-フェニレンジアミン・硫酸塩等の直接染料も用いられうる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの存在下における染色対象物と染料との接触は、例えば、染料と該中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I とを使用時に混合して染色対象物と接触するか、あるいは嫌気性条件下で保存した染料と該中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I との混合物を使用時に大気中で染色対象物と接触することにより行なわれる。本発明の染色方法は、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、染色用組成物として用いることにより行なわれうる。

本発明の染色用組成物としては、本発明の中性フェノールオキシダーゼと染料とを含有した組成物; 本発明の中性フェノールオキシダーゼを含有した組成物 A と染料等を含有した組成物 B との組み合わせ等が挙げられる。

本発明の染色用組成物には、酵素活性を阻害しない範囲で、チオ乳酸、亜硫酸ナトリ

ウム、N-アセチル-L-システイン等の還元剤を配合することができる。また、本発明の効果を損なわない範囲で、前記成分の他に、界面活性剤、油性成分、シリコーン類、増粘剤、溶剤、水、キレート剤、香料等を適宜配合することもできる。

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、高い安定性を示し、種々の基質、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物のいずれに対しても至適pHに大きな変動がなく、中性付近のpHで効率よく基質と作用するという優れた効果を奏する。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼの生産方法によれば、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、効率よく、簡便に、安価に、かつ大量に得ることができるという優れた効果を奏する。さらに、本発明の抗体によれば、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、簡便に、回収、精製できるという優れた効果を奏する。また、本発明の染色方法によれば、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物等により、簡便に、効率よく、繊維や毛髪を染色することができ、さらには、環境、人体等への影響が低減するという優れた効果を奏する。さらに染色用組成物は、取扱いが簡便であり、簡便に、効率よく、繊維や毛髪を染色することができ、さらには、環境、人体等への影響が低減するという優れた効果を奏する。

以下、実施例により、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例により、何ら限定されるものではない。

実施例1 エノキダケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕 IF030601株のフェノールオキシダーゼの検索及び調製

(1) 培養条件の検討

フェノールオキシダーゼの誘導のための培養条件のうち、培養pH条件の検討を例と

して挙げる。

ラッカーゼの製造法については、特公昭60-156385号公報において、イルベックス・ラリテウス ATCC 20123を用い、pH 6.0で3日間培養を行なうことにより、至適pHが4.5付近の酸性ラッカーゼを得る方法が開示されている。

本実施例においては、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO 30601株において、フェノールオキシダーゼを誘導する培養方法の決定するために、培地のpHを4.0から9.0の範囲で任意に調整し、培養を行なうことにより、培養pH条件を検討した。

以下に示す播種、菌糸体の切り分け、及び培地の添加の各操作をクリーンベンチ内で行なった。

固体培養用寒天培地〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフィコ (Difco) 社製〕、2.0重量% 寒天、残部 水〕10mlを含む滅菌シャーレに、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO 30601株を1白金耳相当量播種し、25℃で10日間培養した。その後、寒天培地全体に成長した菌糸体を、滅菌した白金耳にて5mm四方に切り分け、小片を得た。

前記小片 10片を、液体培養用培地1〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフィコ (Difco) 社製〕、残部 水；121℃で15分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で7日間、往復振盪培養(150往復/分)を行なった。なお、前記液体培養用培地1として、pHを4.0から9.0の範囲で任意に調整された培地のそれぞれを用いた。

それぞれ培養pHの異なる培養液サンプルを毎日サンプリングし、その酵素活性の変化を求めることにより、培養pH条件による酵素誘導の違いを明らかにした。

酵素活性(酸化活性)は、酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)又はトリス塩酸緩衝

液 (pH 8.0) を緩衝液とし、パラフェニレンジアミンを基質として用いて、470 nmにおける吸光度の変化により測定した。

具体的には、96穴のマイクロプレート〔コーニング (Corning) 社製、Costar (登録商標) 3368〕のウェル内で、0.2 M 緩衝液 0.1 ml に、0.025 M パラフェニレンジアミン水溶液 0.08 ml を添加し、基質溶液を調製した。この基質溶液と各サンプリングした培養液 0.02 ml とを混合して、470 nmにおける吸光度の変化を、Multi Spectrometer〔大日本製薬株式会社製、商品名：Viento〕を用いて測定することにより、酵素活性を求めた。なお、酵素活性は、470 nmにおける吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位 (U：ユニット) として定義した。

各培養 pH 条件で7日間培養を行なった結果、pH 5.0 及び pH 8.0 のそれぞれの反応 pH における酵素活性測定は、共に、培養日数が7日目で酵素活性が最も高く、すべての培養 pH 条件で、培養日数の経過により、酵素活性の増加を示した。

pH 5.0 にて酵素活性を測定した結果、pH 4.0 から 9.0 の pH 範囲で培養した各培養液において、すべて明確な酵素活性がみられなかった。具体的には、最も高い酵素活性を示したのは、pH 9.0 の培養 pH 条件で7日間培養することにより得られた培養液だったが、反応開始から17時間後の470 nmにおける吸光度の変化は、わずか0.12であった。また、pH 6.0 の培養 pH 条件で7日間培養することにより得られた培養液について、17時間後の470 nmにおける吸光度の変化は、0.06であった。

一方、pH 8.0 にて酵素活性を測定した結果、pH 5.0 から 9.0 の pH 範囲で培養した各培養液において、すべて明確な酵素活性が示された。なお、pH 4.0 で培養することにより得られた培養液は、明らかな酵素活性を示さなかったが、培養日数による酵素活性の増加はみられた。

また、培養pHがより高いpHである培養液ほど、高い酵素活性を示した。最も高い酵素活性を示した培養液は、pH9.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液で、17時間後の470nmにおける吸光度の変化は、1.27であった。また、pH6.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液について、17時間後の470nmにおける吸光度の変化は、0.78であった。

以上の結果から、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601株において、前記培養条件により誘導されるフェノールオキシダーゼは、中性フェノールオキシダーゼであり、また、酸性側に至適pHを有する酸性ラッカーゼ又は酸性フェノールオキシダーゼは誘導されないことがわかった。また、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601株においては、前記培養条件により、多量の酵素が誘導され、pH8.0での酵素活性では、pH9.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液の酵素活性は、pH6.0の培養pH条件で7日間培養することにより得られた培養液の酵素活性と比較して、約1.6倍も高くなることがわかった。

このように、前記培養条件により、中性フェノールオキシダーゼを誘導することができ、該中性フェノールオキシダーゼを収率よく生産することができる。

(2) 培養法の検討

以下に示す播種、菌糸体の切り分け、及び培地の添加の各操作をクリーンベンチ内で行なった。なお、かかる培養では、まず、菌体を生育させる培養を行ない、ついで、酵素生産量を増加させる培養を行なう方法を検討した。

固体培養用寒天培地〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフィコ (Difco) 社製〕、2.0重量% 寒天、残部 水〕 10mlを含む滅菌シャーレに、エノキダケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velut*

i p e s)] I F O 3 0 6 0 1 株を1白金耳相当量播種し、25℃で10日間培養した。その後、寒天培地全体に成長した菌糸体を、滅菌した白金耳にて5mm四方に切り分けた。

前記小片 10片を、液体培養用培地1〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースプロス〔ディフィコ (D i f c o) 社製〕、残部 水 (pH5.2)；121℃で15分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で7日間、往復振盪培養(150往復/分)を行なった。

得られた培養液全量を、2L容の三角フラスコ中500mlの前記液体培養用培地1に添加し、25℃で3週間、往復振盪培養(100往復/分)を行なった。

その後、成長したペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、培養液を取り去り、残部の菌糸体に、液体培養用培地2〔組成：1.0重量% グルコース、0.1重量% 酵母エキス、0.14重量% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.36重量% K_2HPO_4 、0.02重量% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.10重量% ミネラル混合液(組成：1.0重量% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.0重量% ZnCl_2 、0.7重量% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、pH9.2；121℃で15分間滅菌したもの〕500mlを添加し、さらに25℃で3日間培養した。

その後、成長したペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、デカンテーションにより培養液を回収した。

回収された培養液は、淡黄色若しくは黄褐色の清澄又は濁った液体であった。回収された培養液は、全容量3060ml、総力価13100U、総タンパク質量778mg、比活性16.8U/mgタンパク質であった。

(3) 粗酵素液の調製

前記(2)で回収された培養液を減圧濾過し、濾液を得た。

前記濾液のpHを1M 水酸化ナトリウム水溶液により7.5に調整した。pH調整後の濾液1Lに対して、5g（乾燥重量）のDEAE-セルロース〔シグマ（Sigma）社製〕担体を添加し、4℃で30分間振盪攪拌した。その後、10分間静置し、上清を除去した。

回収されたDEAE-セルロース担体を、該担体の3倍容量の1M 塩化ナトリウムを含有した0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）に添加した。得られた混合溶液を5分間振盪攪拌して、DEAE-セルロース担体に吸着したタンパク質を溶出させた。得られたDEAE-セルロース溶出液を、減圧濾過にて回収し、4℃で脱イオン水に対して透析し、得られた産物を凍結乾燥し、凍結乾燥物を得た（全重量630mg、総力価7326U、総タンパク質量110mg、比活性66.4U/mgタンパク質）。なお、凍結乾燥物の力価は、該凍結乾燥物 1mgに対して、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0） 1mlに溶解させ、ついで、得られた溶液 0.01mlと、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0） 0.089mlに、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール 0.1ml（終濃度0.005mM）を添加して得られた基質溶液とを混合し、得られた混合物について、前記（1）に記載の手法と同様に、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を求めた。また、前記凍結乾燥物の水溶液について、F o l m - L o w r y法により、タンパク質量を定量した。

前記DEAE-セルロースで得られた凍結乾燥物を再度溶解させた溶液を、n a t i v e - P A G Eに供し、電気泳動後に得られたゲルを、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で20分間振盪攪拌した。その後、0.005M 2,6-ジメトキシフェノール、0.005M オルト-アミノフェノール及び0.001M パラ-フェニレンジアミンのいずれかを含み0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）中でゲルを5分間振盪攪拌することにより活性染色を行なった。活性染色の結果を図1

に示す。

図1に示すように、活性染色の結果より、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*) IFO30601株を前記(2)に示される培養方法にしたがって培養することによって生産される培養液には、少なくとも3つの中性フェノールオキシダーゼが含まれることがわかった。

(4) 中性フェノールオキシダーゼの精製〔イオン交換クロマトグラフィー (Q-セファロースカラム)〕

前記(3)で得られた凍結乾燥物630mgを、0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 10mlに溶解させ、商品名:DISMIC-13P〔アドバンテック (ADVANTEC) 社製〕を用いて、遠心濾過により不溶物を除去し、濾液を得た。

前記濾液 49mlを、FPLCシステム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化された商品名:Q-セファロースカラム〔2.6×10cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供した。塩化ナトリウム水溶液を0から1Mの濃度範囲で用いた勾配溶出法により、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼのうちの2種 (中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼII) を溶出した。中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの画分は、得られた各溶出画分について、470nmにおける2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性と、native-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色とを行なうことにより決定された。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2M リン酸ナトリウム (pH7.0) 0.896mlに、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1mlを添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と、溶出画分 0.

0.04 ml とを混合し、得られた混合物について、470 nm における吸光度の変化を測定することにより、算出した。

イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムを図2に示す。図2において、280 nm における吸光度（図2中、A280）の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、400 nm における吸光度（図2中、A400）の変化は、各フラクション中の糖質量の変化を示し、470 nm における吸光度（図2中、A470）の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の各画分について、native-PAGE 後のパラフェニレンジアミンによる活性染色は単一のバンドを示したが、native-PAGE 後のクーマシーブリリアントブルー染色では、複数のバンドがみられた。得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II のそれぞれの画分を回収し、透析後、凍結乾燥を行なった。

得られた中性フェノールオキシダーゼ I の画分は、全容量 7.5 ml、総力価 2505 U、総タンパク質量 5.4 mg、比活性 463.9 U/mg タンパク質であった。また、中性フェノールオキシダーゼ II の画分は、全容量 10.5 ml、総力価 3630 U、総タンパク質量 41.0 mg、比活性 88.5 U/mg タンパク質であった。

(5) 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の精製 〔ゲル濾過クロマトグラフィー〕

前記(3)で得られた中性フェノールオキシダーゼ I の凍結乾燥物を、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1.5 ml に溶解させた。得られた産物を、FPLC システム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名：セファクリル S-100 HR カラム〔1.6 × 60

cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製] に供した。ついで、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼ I を溶出させた。

中性フェノールオキシダーゼ I について、ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを図 3 に示す。図 3 において、280 nm における吸光度 (図 3 中、A 280) の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470 nm における吸光度 (図 3 中、A 470) の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

中性フェノールオキシダーゼ I の画分は、得られた画分について、470 nm における 2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性の測定と、SDS-PAGE 後のパラフェニレンジアミンによる活性染色と、SDS-PAGE 後のクーマシーブリリアントブルー染色とを行なうことにより決定された。SDS-PAGE 後のパラフェニレンジアミンによる活性染色及びクーマシーブリリアントブルー染色の結果、単一のバンドを示した。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2 M リン酸ナトリウム (pH 7.0) 0.896 ml に、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml を添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と中性フェノールオキシダーゼ I の画分 0.004 ml とを混合し、得られた混合物について、470 nm における吸光度の変化を測定することにより求めた。

酵素活性を示し、活性染色により染色された画分を、中性フェノールオキシダーゼ I として回収した。得られた中性フェノールオキシダーゼ I の画分は、全容量 10 ml、総力価 1530 U、総タンパク質量 1.6 mg、比活性 956.3 U/mg タンパク質であった。

一方、前記 (3) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I の凍結乾燥物を、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1.5 ml

1 に溶解させた。得られた産物を、FPLCシステム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.1M 塩化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名：セファクリル S-100 HRカラム〔1.6×60cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供した。ついで、0.1M 塩化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて、前記カラムに吸着された本発明の中性フェノールオキシダーゼ I I を溶出した。

中性フェノールオキシダーゼ I I について、ゲルクロマトグラフィーのクロマトグラムを図4に示す。図4において、280nmにおける吸光度 (図4中、A280) の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470nmにおける吸光度 (図4中、A470) の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

本発明の中性フェノールオキシダーゼ I I の画分は、得られた画分について、470nmにおける2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性の測定と、SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色と、SDS-PAGE後のクーマシーブリリアントブルー染色とを行なうことにより決定された。SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色、及び、クーマシーブリリアントブルー染色の結果、単一のバンドを示した。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2M リン酸ナトリウム (pH 7.0) 0.896mlに0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1mlを添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と中性フェノールオキシダーゼ I I の画分 0.004mlとを混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化により測定することにより求めた。

酵素活性を示し、活性染色により染色された画分を、中性フェノールオキシダーゼ I I として回収した。得られた中性フェノールオキシダーゼ I I の画分は、全容量11.5ml、総力価742U、総タンパク質量5.3mg、比活性140U/mgタンパク

質であった。

上記の抽出・精製のスキームを図5に示す。また、各精製工程における中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの精製度、比活性を表1に示す。

表1

精製工程		総タンパク質量 (mg)	総力価 (U)	比活性 (U/mgタンパク質)	収率 (%)
培養液		778	13100	16.8	100.0
DEAE-セルロース		110	7326	66.4	55.9
Q-セファロース	中性フェノールオキシダーゼI	5.4	2505	463.9	19.1
	中性フェノールオキシダーゼII	41.0	3630	88.5	27.7
セファクリル S-100 HR	中性フェノールオキシダーゼI	1.6	1530	956.3	11.7
	中性フェノールオキシダーゼII	5.3	742	140.0	5.7

(6) 中性フェノールオキシダーゼIIIの精製〔イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-セルロースカラム)〕

前記実施例1の(2)に記載の方法と同様に、培養液を回収した。回収された培養液は、全容量4000ml、総力価26800U、総タンパク質量1188mg、比活性22.5U/mgタンパク質であった。

回収された培養液を、透析膜〔商品名: Dialysis membrane, Size 36 (和光純薬 (WAKO) 社製)〕に、250mlずつ入れた。得られたチューブを、ビニール袋に入れ、該チューブに、約120gのポリエチレングリコール2000〔和光純薬株式会社製〕をまぶした後、該チューブが入ったビニール袋を氷中で約48時間保持して、培養液を濃縮した。濃縮培養液を、小型高速冷却遠心機〔トミー (TOMY) 社製、ローターNo. 8.1〕を用いて4℃、10,000回転にて20分間遠心分離して、沈殿を除去した。得られた培養液濃縮物は、全容量229ml、総力価9814U、総タンパク質量193.6mg、比活性50.7U/mgタンパク質

であった。

前記培養液濃縮物を、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して 4℃で一晩透析した。小型高速冷却遠心機〔トミー (TOMY) 社製、ローターNo. 8.1〕を用いて4℃、12000回転にて30分間遠心分離した上清を、商品名: Disposable syringe filter unit〔セルロースアセテート、0.45 μ m、アドバンテック (ADVANTEC) 社製〕を用いて濾過して、不溶物を除去し、それにより、濾液を得た。

前記濾液 229ml を、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したDEAE-セルロースカラム〔シグマ (Sigma) 社製、2.6 \times 60cm〕に供した。塩化ナトリウムを0から1Mの濃度範囲で用いた勾配溶出法により、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼIIIを溶出した。中性フェノールオキシダーゼIIIの画分は、得られた溶出画分について、470nmにおける2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性と、SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色とを行なうことにより決定された。

中性フェノールオキシダーゼIIIについて、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーのクロマトグラムを図6に示す。図6において280nmにおける吸光度 (図6中、A280) の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470nmにおける吸光度 (図6中、A470) の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.895ml に、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1ml を添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と溶出画分 0.005ml とを混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、算出した。

得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分は、全容量18ml、総力価11

0.2 U、総タンパク質量 3.6 mg、比活性 303 U/mg タンパク質であった。

(7) 中性フェノールオキシダーゼ III の精製〔イオン交換クロマトグラフィー (Q-セファロースカラム)〕

得られた中性フェノールオキシダーゼ III の画分を回収し、得られた画分を、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して 4℃で一晩透析した。商品名: Disposable syringe filter unit〔セルロースアセテート、0.45 μm、アドバンテック (ADVANTEC) 社製〕を用いて濾過して、不溶物を除去し、それにより、濾液を得た。

前記濾液 21.5 ml を、FPLC システム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化された商品名: Q-セファロースカラム〔2.6 × 10 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製〕に供した。塩化ナトリウムを 0.2 から 0.5 M の濃度範囲で用いた勾配溶出法により、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼ III を溶出した。中性フェノールオキシダーゼ III の画分は、得られた溶出画分について、470 nm における 2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性と、SDS-PAGE 後のパラフェニレンジアミンによる活性染色とを行なうことにより決定された。

中性フェノールオキシダーゼ III について、Q-セファロースカラムクロマトグラフィーのクロマトグラムを図 7 に示す。図 7 において 280 nm における吸光度 (図 7 中、A280) の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470 nm における吸光度 (図 7 中、A470) の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.895 ml に、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml を添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と溶出画分

0.005mlとを混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、算出した。

得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分は、全容量18ml、総力価115U、総タンパク質量1mg、比活性117.4U/mgタンパク質であった。

前記中性フェノールオキシダーゼIIIの画分は、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に対して4℃、3時間透析した。商品名: Disposable syringe filter unit [セルロースアセテート、0.45μm、アドバンテック(ADVANTEC)社製]を用いて濾過し、不溶物を除去して濾液を得た。得られた濾液を、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したDEAE-セルロースカラム[シグマ(Sigma)社製、1.5×5.5cm]に供した。ついで、1M 塩化ナトリウムを含む0.05M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を用いて、前記カラムに吸着された中性フェノールオキシダーゼIIIを溶出させた。

中性フェノールオキシダーゼIIIの画分は、得られた画分について、2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性の測定と、SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色と、SDS-PAGE後のクーマシーブリリアントブルー染色とを行うことにより決定された。SDS-PAGE後のパラフェニレンジアミンによる活性染色の結果では、メジャーな一本のバンドと、マイナーな二本のバンドが認められた。SDS-PAGE後のクーマシーブリリアントブルー染色の結果、単一のバンドを示した。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、96穴のマイクロプレート[コーニング(Corning)社製、Coster(登録商標)3368]のウェル内で、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 0.178mlに0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.02mlを添加して、基質溶液を

得、得られた基質溶液と溶出面分 0.002 ml とを混合し、その結果得られた混合物の色の変化を、目視によって確認した。

酵素活性を示し、活性染色により染色された画分を、中性フェノールオキシダーゼ I I I として回収した。得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I の画分は、全容量 3.3 ml、総力価 242 U、総タンパク質量 0.6 mg、比活性 423.3 U/mg タンパク質であった。

上記の中性フェノールオキシダーゼ I I I の抽出、精製のスキームを図 8 に示す。また、各精製工程における中性フェノールオキシダーゼ I I I の精製度、比活性を表 2 に示す。

表 2

精製工程	総タンパク質量 (mg)	総力価 (U)	比活性 (U/mg タンパク質)	収率 (%)
培養液 PEG 濃縮物	194	9814	50.7	100.0
DEAE-セルロース	3.6	1102	303.0	11.2
Q-セファロース	1.0	115	117.4	1.2
DEAE-セルロース	0.6	242	423.3	2.5

実施例 2 中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I の分子量

実施例 1 で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I のそれぞれ分子量を、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたゲル濾過法により測定した。

ゲル濾過クロマトグラフィーには、FPLC システム〔ファルマシア (Pharmacia) 社製〕を用いて、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名: セファクリル S-100 HR カラム〔1.

6×60 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製) を用いた。

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の溶液 3 ml を、FPLC システム [ファルマシア (Pharmacia) 社製] を用いて、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した商品名: セファクリル S-100 HR カラム [1.6×60 cm、ファルマシア (Pharmacia) 社製] に供した。0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて、前記カラムでゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II を溶出させ、溶出液量を測定した。なお、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、それぞれ別々に、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量を決定した。また、前記と同じ条件下で、分子量マーカーとして、分子量既知の 4 種のタンパク質 (分子量約 67 k、43 k、25 k、及び 13.7 kDa) をそれぞれ単独で添加し、それぞれの溶出液量を測定した。

中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ II の溶出時間と、分子量マーカーの溶出液量から得られた検量線とにより、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II のそれぞれの分子量を決定した。

その結果、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II の分子量は、共に、約 72 kDa であった。

また、実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ III の分子量を、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いたゲル濾過法により測定した。

前記実施例 1 の (7) で得られた Q-セファロースカラム後の中性フェノールオキシダーゼ III の画分 (全容量 12 ml、総力価 262 U、総タンパク質量 3.8 mg、比活性 69 U/mg タンパク質) を、商品名: Ultrafree (登録商標) -MC30,000 NMWL Filter Unit [ミリポア (MILLIPORE) 社

製〕を用いて遠心濾過することにより濃縮した。

得られた濃縮液 0.855ml を、商品名：セファデックスG-100〔アマシャム バイオサイエンシーズ (Amersham Biosciences) 社製〕を充填し、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で平衡化したカラム (2.6×60cm) に供した。ついで、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、中性フェノールオキシダーゼIIIを溶出させ、溶出液量を測定した。また、前記と同じ条件で、分子量マーカーとして、分子量既知の5種のタンパク質 (分子量約73kDa、61kDa、47kDa、37kDa、および24kDa) をそれぞれ単独で添加し、それぞれの溶出液量を測定した。

中性フェノールオキシダーゼIIIについて、ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムを図9に示す。図9において280nmにおける吸光度 (図9中、A280) の変化は、各画分中のタンパク質量の変化を示し、470nmにおける吸光度 (図9中、A470) の変化は、各画分中の酵素活性の変化を示す。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性は、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 0.895ml に、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1ml を添加し、基質溶液を得、得られた基質溶液と溶出画分 0.005ml とを混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、算出した。

その結果、中性フェノールオキシダーゼIIIの分子量は約45kDaであった。

前記実施例1の(5)で得られた中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び前記実施例1の(7)で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIのそれぞれの溶液 5μl と、分子量マーカー〔アマシャム バイオサイエンシーズ (Amersham Biosciences) 社製、商品名：LMW calibration kit) 15μl とを同時に12.5% SDS-PAGEに供した。S

DS-PAGE後のゲルを、2.5% Triton (登録商標) X-100を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で60分間振盪攪拌し、その後、1mM パラフェニレンジアミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中でゲルを5分間振盪攪拌することによって活性染色を行なった。その後、蒸留水で5分間洗浄し、染色用溶液〔0.5gのクーマシーブリリアントブルー R250を、500mlのメタノールと100mlの酢酸との混合溶液(600ml)に溶解し、得られた混合溶液を蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整〕に、電気泳動後のゲルを浸すことにより染色を行なった。その後、脱色用溶液〔250mlのメタノールと70mlの酢酸との混合溶液(320ml)を蒸留イオン交換水で全量を1000mlに調整〕で、脱色を行なった。

前記SDS-PAGE法により、本発明の中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれは、単一のバンドを示した。前記SDS-PAGE法による本発明の中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれの分子量は、それぞれ28kDa、35kDa及び45kDaであった。

実施例3 中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれの至適pH

中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIと各基質との反応において、緩衝液として、pHに応じて、0.2M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11.5、10.5及び9.5)、0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 10.0、9.0、8.0及び7.0)、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5、7.0、6.5、6.0及び5.5)、0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5、5.0、4.5、4.0及び3.5)、0.2M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5、

3. 0 及び 2. 0) を用いた。

2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I の画分 0. 0 2 ml と、前記緩衝液のいずれか 0. 8 8 ml と、0. 0 5 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液 0. 1 ml とをマイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、4 7 0 nm における吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (J a s c o) 社製、商品名：v-5 3 0〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

また、オルト-アミノフェノールを基質とした場合、前記 2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、0. 0 5 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0. 0 5 M オルト-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液を用い、同様の操作を行ない、4 2 0 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合、前記 2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、0. 0 5 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0. 0 5 M パラ-フェニレンジアミン水溶液を用い、同様の操作を行ない、4 7 0 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

シリンガルダジンを基質とした場合、前記 2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、0. 0 5 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0. 0 0 5 M シリンガルダジンのエタノール溶液を用い、同様の操作を行ない、5 3 0 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、各基質に対して適切な波長における吸光度を、1 分間で 1 増加させる酵素量を 1 単位 (U : ユニット) とした。

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I それぞれの至適 pH の結果を、図 1 0 及び図 1 1 にそれぞれ示す。なお、図 1 0 及び図 1 1 において、

最大活性を100とした場合の相対活性で示す。また、図10及び図11のそれぞれにおいて、パネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、オルト-アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネルCは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネルDは、シリングアルダジンを基質とした場合を示す。

その結果、図10に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIは、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5~7.0、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5~7.0、パラ-フェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5~6.0、シリングアルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約6.5であることがわかった。

また、図11に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIIは、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5~6.0、オルト-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5~7.0、パラ-フェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、約5.5~6.0、シリングアルダジンを基質として用いた場合、至適pHは、約6.5であることがわかった。

中性フェノールオキシダーゼIIIと各基質との反応において、緩衝液として、pHに応じて、0.2M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH11.5、11、10.5、10及び9.5)、0.2M トリス塩酸緩衝液(pH10、9.5、9、8.5、8、7.5及び7)、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5、7、6.5、6、5.5及び5)、0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5、5、4.5、4及び3.5)、0.2M グリシン塩酸緩衝液(pH4、3.5、3、2.5及び2)を用いた。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合、前記実施例1の(7)で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分0.04mlと、前記緩衝液のいずれか0.

86mlと、0.05M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1mlとをマイクロキュベット中にて充分混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ（Jasco）社製、商品名：v-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

また、オルト-アミノフェノールを基質とした場合、前記実施例1の（7）で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分 0.005mlと、前記緩衝液のいずれか0.895mlと、0.05M オルト-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液 0.1mlとをマイクロキュベット中にて充分混合し、得られた混合物について、420nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ（Jasco）社製、商品名：v-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合、前記実施例1の（7）で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分 0.01mlと、前記緩衝液のいずれか0.89mlと、0.05M パラ-フェニレンジアミン水溶液 0.1mlとをマイクロキュベット中にて充分混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ（Jasco）社製、商品名：v-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

シリングアルダジンを基質とした場合、前記実施例1の（7）で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分 0.02mlと、前記緩衝液のいずれか0.96mlと、0.005M シリングアルダジンのエタノール溶液 0.02mlとをマイクロキュベット中にて充分混合し、得られた混合物について、530nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ（Jasco）社製、商品名：v-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、各基質に対して適切な波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）とした。

中性フェノールオキシダーゼ I I I の至適 pH の結果を、図 1 2 に示す。なお、図 1 2 において、最大活性を 1 0 0 とした場合の相対活性で示す。また、図 1 2 におけるパネル A は、2, 6 - ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B は、オルト - アミノフェノールを基質とした場合を示し、パネル C は、パラ - フェニレンジアミンを基質とした場合を示し、パネル D は、シリングアルダジンを基質とした場合を示す。

その結果、図 1 2 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I I I は、2, 6 - ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適 pH は、約 5. 5、オルト - アミノフェノールを用いた場合、至適 pH は、約 5. 0 ~ 7. 0、パラ - フェニレンジアミンを用いた場合、至適 pH は、約 5. 0 ~ 6. 0、シリングアルダジンを用いた場合、至適 pH は、約 6. 0 であることがわかった。

実施例 4 中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの pH 安定性

中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれと各基質との反応において、緩衝液として、pH に応じて、0. 2 M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11. 5)、0. 2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 10. 0、9. 0 及び 8. 0)、0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7. 0 及び 6. 0)、0. 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5. 0 及び 4. 0)、0. 2 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3. 0 及び 2. 0) を用いた。

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの画分 0. 02 ml と、前記緩衝液のいずれか 0. 18 ml とを混合して、30℃で 1 時間又は 20 時間インキュベートすることにより、前処理を行なった。

ついで、前処理後の精製酵素液 0. 02 ml と前記緩衝液 0. 88 ml と、0.

0.5 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml とを、マイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、470 nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合において、0.05 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05 M パラフェニレンジアミン水溶液を用い、同様の操作を行ない、同じく、470 nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、各基質で定めた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素活性を1単位 (U: ユニット) として定義した。

中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III それぞれの pH 安定性の結果を、図13、図14及び図15にそれぞれ示す。なお、図13、図14及び図15それぞれにおいて、最大活性を100とした相対残存活性で示す。また、図13、図14及び図15それぞれにおいて、パネルA及びBは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルC及びDは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。さらに、図13、図14及び図15それぞれにおいて、パネルA及びCは、1時間後の pH 安定性を示し、パネルB及びDは、20時間後の pH 安定性を示す。

その結果、図13に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I は、1時間処理の場合、pH 7.0~10.0で安定であり、最大活性に対し、75%以上の相対残存活性が保持されていた。また、20時間処理の場合、pH 8.0~9.0で安定であり、最大活性に対し、70%以上の相対残存活性が保持されていた。

また、図14に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ II は、1時間処理の場合、pH 6.0~10.0で安定であり、最大活性に対し、75%以上の相対残存活

性が保持されていた。また、20時間処理の場合、pH 7.0～10.0で安定であり、最大活性に対し、75%以上の相対残存活性が保持されていた。

図15に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIIIは、1時間処理の場合、pH 7.0～11.5で安定であり、最大活性に対し、50%以上の相対残存活性が保持されていた。また、20時間処理の場合、pH 8.0～10.0で安定であり、最大活性に対し、70%以上の相対残存活性が保持されていた。

実施例5 中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれの等電点

前記実施例1の(5)で得られた中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び前記実施例1の(7)で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれの等電点を調べるため、ポリアクリルアミドゲルを用いて等電点電気泳動を行なった。具体的には、終濃度2%になるように、商品名：Pharmalyte (pH 3-10;ファルマシア(Pharmacia)社製)をアクリルアミド中に溶解し、過硫酸アンモニウム及びN, N, N', N'-テトラメチル-エチレンジアミン(TEMED)を添加することにより、終濃度5%のポリアクリルアミドゲルを調製した。電極液としては、1.0M 水酸化ナトリウム水溶液を陰極液として、0.5M 酢酸を陽極液として用いた。50Vの定電圧で6時間泳動を行なった。ゲル上の活性染色は、0.001M パラーフェニレンジアミンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に、泳動後のゲルを浸漬し、振盪攪拌することにより行なった。等電点の測定は、泳動後、ゲル上の試料を泳動していない部分の両端を、2.5mmの幅で切り出し、得られた小片を脱イオン水に浸して、4℃で抽出した液のpHを測定することにより行なった。

中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノール

ルオキシダーゼ I I I それぞれの等電点電気泳動の結果を図 1 6 に示す。

その結果、図 1 6 に示されるように、ポリアクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動により、中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I の等電点は、それぞれ、7. 4、6. 8 及び 6. 8 と決定された。

実施例 6 中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの至適温度

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I について、それぞれの酵素活性を、種々の温度条件 (20、30、40、50、60、70、及び 80℃) 下にて、それぞれ別々に測定した。

具体的には、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いる場合、マイクロセントリフュージチューブ [ポレックスバイオプロダクツインコーポレティッド (Porex BioProducts Inc.) 社製] 中、0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6. 5) 0. 88 ml と、0. 05 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液 0. 1 ml と、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I の画分 0. 02 ml とを混合し、得られた混合物について、各反応温度にて 5 分間反応を行なった。その後、得られた反応液に、2 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3. 0) 0. 1 ml を添加することにより、酵素反応を停止させた。

また、パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記 2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の酵素活性の測定法において、2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0. 05 M パラフェニレンジアミン水溶液を用いて同様に操作を行なった。

ついで、得られた反応産物について、分光光度計〔ジャスコ（J a s c o）社製、商品名：V-530〕により、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合及びパラ-フェニレンジアミンを基質とした場合共に、470 nmにおける吸光度を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、470 nmにおける吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U：ユニット）として定義した。

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I の至適温度の結果を、図17及び図18にそれぞれ示す。なお、図17及び図18において、最大活性を100とした相対活性で示す。また、図17及び図18のそれぞれにおいて、パネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、パラ-フェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

その結果、図17に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I の至適温度は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、20～50℃で、最大活性に対し、80%以上の相対活性を有しており、パラ-フェニレンジアミンを基質として用いた場合、30～60℃で最大活性に対し、60%以上の相対活性を有していることがわかった。

また、図18に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I I の至適温度は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、30～60℃で、最大活性に対し、70%以上の相対活性を有しており、パラ-フェニレンジアミンを基質として用いた場合、40～70℃で、最大活性に対し、80%以上の相対活性を有していることがわかった。

一方、前記実施例1の(7)で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I について、種々の温度条件（20、30、40、50、60、70、及び80℃）下にて測定した。

具体的には、2, 6-ジメトキシフェノールを基質として用いる場合、キュベット中

で、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.88 ml と、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml とを混合し、得られた混合物について、各反応温度にて10分間加温したものを、基質溶液とした。

実施例1の(7)で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分を、蒸留イオン交換水で10倍に希釈し、酵素溶液を得た。得られた酵素溶液 0.02 ml を、前記基質溶液に添加し、十分混合した。

得られた混合物について、各反応温度にて5分間反応を行なった。ついで、得られた反応産物について、470 nmにおける吸光度を分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名：V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合における、0.05 M 2,6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05 M パラフェニレンジアミン水溶液を用い、同様の操作を行い、同じく、470 nmにおける吸光度を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、470 nmにおける吸光度を、1分間で1増加させる酵素活性を1単位 (U: ユニット) として定義した。

中性フェノールオキシダーゼIIIの至適温度の結果を、図19に示す。なお、図19において、最大活性を100とした相対活性で示す。また、図19において、パネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネルBは、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

その結果、図19に示されるように、中性フェノールオキシダーゼIIIの至適温度は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、20~50℃で最大活性に対し、70%以上の相対活性を有しており、パラフェニレンジアミンを基質として用いた場合、20~60℃で最大活性に対し、60%以上の相対活性を有していることがわかった。

実施例7 中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれの熱安定性

pH7.0及びpH9.0のそれぞれにおいて、中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIの熱安定性を調べた。

前記実施例1の(5)で得られた中性フェノールオキシダーゼI又は中性フェノールオキシダーゼIIの画分0.005mlを、種々の温度(20、30、40、50、60、70、及び80℃)下にて、0.045mlの0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)(全量0.005ml)中で、種々の時間(5、10、20、40、及び60分間)インキュベートすることにより、前処理を行なった。

2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合、前処理を行なった酵素溶液0.02mlと、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)0.88mlと、0.05M2,6-ジメトキシフェノール水溶液0.1mlとを、マイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、470nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ(Jasco)社製、商品名:V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

また、パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、2,6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05Mパラフェニレンジアミン水溶液を用いて同様に操作を行ない、同じく、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、470nmにおける吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位(U:ユニット)として定義した。

中性フェノールオキシダーゼI及び中性フェノールオキシダーゼIIのそれぞれのpH9.0における熱安定性を求める場合、前記pH7.0における前処理の代わりに、

前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I の画分 0.048 ml を、種々の温度 (30、40、50、60、70、及び 80℃) 下にて、0.012 ml の 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中で、種々の時間 (5、10、20、40、及び 60 分間) インキュベートすることにより、前処理を行なった。

中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I の熱安定性の結果を、図 20 及び図 21 にそれぞれ示す。なお、図 20 及び図 21 において、最大活性を 100 とした相対残存活性で示す。また、図 20 及び図 21 のそれぞれにおいて、パネル A 及び B は、pH 7.0 における熱安定性を示し、パネル C 及び D は、pH 9.0 における熱安定性を示す。さらに、図 20 及び図 21 のそれぞれにおいて、パネル A 及び C は、2,6-ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B 及び D は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

その結果、図 20 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I の pH 7.0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、30℃まで、最大活性に対して、80%以上の相対残存活性を有していることがわかった。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼ I の pH 9.0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、30℃まで、最大活性に対して、90%以上の相対残存活性を有していることがわかった。

また、図 21 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I I の pH 7.0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、50℃まで、最大活性に対して、90%以上の相対残存活性を有していることがわかった。また、中性フェノールオキシダーゼ I の pH 9.0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、50℃まで、最大活性に対して、70%以上の相対残存活性を有していることがわかった。

また、pH 7.0 及び pH 9.0 のそれぞれにおいて、中性フェノールオキシダーゼ I I I の熱安定性を調べた。

中性フェノールオキシダーゼ I I I の pH 7.0 における熱安定性を調べる場合、前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I の画分 0.0125 ml を、種々の温度 (20、30、40、50、60、70、及び 80℃) 下にて、0.0375 ml の 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) (全量 0.05 ml) 中で、種々の時間 (5、10、20、40、及び 60 分間) インキュベートすることにより、前処理を行った。

2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合、前処理を行なった酵素溶液 0.02 ml と、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.88 ml、0.05 M 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液 0.1 ml とをキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、470 nm における吸光度の変化を分光光度計 [ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: v-530] を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

パラフェニレンジアミンを基質とした場合、前記 2, 6-ジメトキシフェノールを基質とした場合の評価法において、2, 6-ジメトキシフェノール水溶液の代わりに、0.05 M パラフェニレンジアミン水溶液を用いて同様に操作を行ない、同じく、470 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、470 nm における吸光度を、1 分間で 1 増加させる酵素量を 1 単位 (U: ユニット) として定義した。

中性フェノールオキシダーゼ I I I の pH 9.0 における熱安定性を求める場合、前記 pH 7.0 における前処理の代わりに、前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I の画分 0.0125 ml を、種々の温度 (20、30、40、50、60、70、及び 80℃) 下にて、0.0375 ml の 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) (全量 0.05 ml) 中で、種々の時間 (5、10、20、40、及び 60 分間) インキュベートすることにより、前処理を行なった。

中性フェノールオキシダーゼ I I I の熱安定性の結果を、図 2 2 に示す。なお、図 2 2 において、インキュベーション前の酵素活性を 1 0 0 とした相対残存活性で示す。また、図 2 2 のパネル A 及び B は、p H 7 . 0 における熱安定性を示し、パネル C 及び D は、p H 9 . 0 における熱安定性を示す。さらに、図 2 2 において、パネル A 及び C は、2 , 6 - ジメトキシフェノールを基質とした場合を示し、パネル B 及び D は、パラフェニレンジアミンを基質とした場合を示す。

その結果、図 2 2 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I I I の p H 7 . 0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、3 0 ° C まで、インキュベーション前の酵素活性に対して、8 0 % 以上の相対残存活性を有していることがわかった。また、中性フェノールオキシダーゼ I I I の p H 9 . 0 における熱安定性は、1 時間後の結果において、4 0 ° C まで、インキュベーション前の酵素活性に対して 9 0 % 以上の相対残存活性を有していることがわかった。

実施例 8 本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの基質特異性

本発明の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの基質特異性を調べるために、パラフェニレンジアミン、4 - ヒドロキシインドール、2 - メトキシフェノール、2 , 6 - ジメトキシフェノール、カテコール、パラアミノフェノール、オルトアミノフェノール、シリングアルダジン、ビリルビン、A B T S、N N S、及び L - チロシンを基質として用い、基質特異性を調べた。

本発明の中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I それぞれについて、パラフェニレンジアミン、4 - ヒドロキシインドール、2 - メトキシフェノール、2 , 6 - ジメトキシフェノール、カテコール、A B T S、N N S を基質と

して用いた場合、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I の画分 0.02 ml と、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.88 ml と、0.05 M 基質水溶液 0.1 ml とをマイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合物について、各基質で定めた波長における吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (J a s c o) 社製、商品名: V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

パラアミノフェノール又はオルトアミノフェノールを基質とする場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.05 M ジメチルスルホキシド溶液を用いて同様に操作を行ない、各基質で定めた波長における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

シリンガルダジンを基質とした場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.005 M シリンガルダジンのエタノール溶液を用い、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I それぞれの画分 0.02 ml と、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.96 ml と、0.005 M シリンガルダジンエタノール溶液 0.02 ml とをマイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合物について、530 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

ビリルビンを基質とする場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.01 M ジメチルスルホキシド溶液を用いて、同様に操作を行ない、450 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

Ｌーチロシンを基質とした場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.001 M Ｌーチロシンを含む 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用い、前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I それぞれの画分 0.02 ml と、0.

0.01 M L-チロシンを含む 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 0.98 ml とをマイクロキュベット内で十分混合し、得られた混合物について、490 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

中性フェノールオキシダーゼ III について、パラフェニレンジアミン、4-ヒドロキシインドール、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、ABTS を基質として用いた場合、前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ III の画分 0.04 ml と、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.86 ml と、0.05 M 基質水溶液 0.1 ml とをキュベット中で十分混合し、得られた混合物について、各基質で定めた波長における吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: V-530〕を用いて測定することにより、酵素活性を評価した。

パラアミノフェノール又はオルトアミノフェノールを基質として用いた場合、前記酵素活性の評価法において、前記 0.05 M 基質水溶液の代わりに、0.05 M 基質のジメチルスルホキシド溶液を用いて同様に操作を行ない、各基質で定めた波長における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

NNS を基質として用いた場合、前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ III の画分 0.04 ml と、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.94 ml と、0.005 M NNS 水溶液 0.02 ml とをキュベット中で十分混合し、得られた混合物について、410 nm における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

シリングアルダジンを基質として用いた場合、前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ III の画分 0.04 ml と、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.86 ml と、0.005 M シリングアルダジンのエタノール溶液 0.1 ml とをキュベット中で十分混合し、得られた混合物について、530 n

mにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

ビリルピンを基質として用いた場合、前記実施例1の(7)で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分 0.04mlと、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5) 0.94mlと、0.0005M ビリルピンのジメチルスルホキシド溶液 0.02mlとをキュベット中で十分混合し、得られた混合物について、450nmにおける吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、各基質で定められた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位(U:ユニット)として定義した。

中性フェノールオキシダーゼI、中性フェノールオキシダーゼII及び中性フェノールオキシダーゼIIIそれぞれについて、各基質における測定波長及び結果を、表3、表4及び表5に示す。

表3

中性フェノールオキシダーゼI

基質	測定波長(nm)	活性(U)
パラフェニレンジアミン	470	0.038
4-ヒドロキシインドール	470	0.005
2-メトキシフェノール	470	0.022
2,6-ジメトキシフェノール	470	0.234
カテコール	400	0.016
パラアミノフェノール	400	0.032
オルトアミノフェノール	420	0.072
シリンガルダザイン	530	0.596
ビリルピン	530	-0.215
ABTS	420	0.320
NNS	490	-0.017
L-チロシン	490	0.000

表 4

中性フェノールオキシダーゼ II

基質	測定波長 (nm)	活性 (U)
パラフェニレンジアミン	470	0.070
4-ヒドロキシインドール	470	0.016
2-メトキシフェノール	470	0.080
2, 6-ジメトキシフェノール	470	0.676
カテコール	400	0.032
パラアミノフェノール	400	0.068
オルトアミノフェノール	420	0.130
シリンガルダザイン	530	1.014
ビリルビン	530	-0.458
ABTS	420	0.752
NNS	490	-0.032
L-チロシン	490	0.000

表 5

中性フェノールオキシダーゼ III

基質	測定波長 (nm)	活性 (U)
パラフェニレンジアミン	470	0.080
4-ヒドロキシインドール	470	0.022
2-メトキシフェノール	470	0.075
2, 6-ジメトキシフェノール	470	0.557
カテコール	400	0.025
パラアミノフェノール	400	0.072
オルトアミノフェノール	420	0.174
シリンガルダザイン	530	1.142
ビリルビン	530	-0.100
ABTS	420	0.847
NNS	490	-0.015
L-チロシン	490	0.000

表 3、表 4 及び表 5 のそれぞれの結果より、中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III は、フェノールオキシダーゼ活性を有することがわかった。より詳しくは、中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III は、共にシリンガルダジン及び ABTS の直接酸化（発色）反応を触媒することから、ラッカーゼ活

性を有し、加えて、ビリルビンの直接酸化による分解反応を触媒することから、ビリルビンオキシダーゼ活性をも有することが示される。しかし、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II は、共に L-チロシンの直接酸化（発色）反応を触媒しないことから、チロシナーゼ活性は有していない。

また、中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III は、フェノールオキシダーゼ・メディエーターである ABTS、NNS を基質として酸化することから、これらの基質をメディエーターとして仲介することによる、酵素反応の増強や、従来触媒されにくかった（触媒されなかった）反応をも効率よく行なうこと等ができる。

実施例 9 中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III の基質特異性（直接的酸化反応）

上記実施例 1 の（5）で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II のそれぞれについて、種々の化合物に対する基質特異性（直接的酸化反応）を、基質の酸化重合による発色反応で測定した。

基質としては、ジアミン化合物、アミノフェノール系化合物、フェノール化合物及びその他の化合物（抽出物）を用いた。基質溶液として、1.0%（V/V）〔パラ-アミノフェノール、トリメチルヒドロキノン、ナフトール化合物、及びインドール化合物は、10%（V/V）〕のジメチルスルホキシドを含む 0.01M 基質水溶液（その他の化合物については、2.0mg/ml の基質水溶液）を用いた。

詳細には、前記酵素を含む酵素水溶液 0.8ml に、1.0M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）0.1ml 又は 1.0M トリス塩酸緩衝液（pH 9.0）0.1ml を添加し、得られた混合物に、0.01M 基質溶液（その他の化合物については、2.0mg/ml）0.1ml を混合した。ついで、得られた混合物につい

て、紫外可視分光光度計（島津製作所社製、商品名：UV-2450）を用いて、吸光度の変化を測定し、酵素活性（発色活性）を調べた。なお、酵素活性は、吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U；ユニット）として定義した。比較のために、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼについても、同様に、pH 6.5及び9.0それぞれにおける基質特異性を調べた。

実施例1の（7）で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの、種々の化合物に対する基質特異性（直接的酸化反応）を、基質の酸化重合による発色反応で測定した。

基質としては、ジアミン化合物、アミノフェノール化合物、フェノール化合物、ナフトール化合物、インドール化合物及びその他の化合物（抽出物）を用いた。基質溶液として、1%（V/V）〔パラ-アミノフェノール、トリメチルヒドロキノン、ナフトール化合物、及びインドール化合物は10%（V/V）〕のジメチルスルホキシドを含む0.01M 基質水溶液（その他の化合物については、2.0mg/mlの基質水溶液）を用いた。

具体的には、前記実施例1の（7）で得られた中性フェノールオキシダーゼIIIの画分 0.005mlと、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）又は0.2M トリス塩酸緩衝液（pH 9.0） 0.5mlと、蒸留イオン交換水 0.395mlと、前記基質水溶液 0.1mlと十分混合した。得られた混合物について、紫外可視分光光度計〔島津製作所社製、商品名：UV-2450〕を用いて、各基質で定めた波長における吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を評価した。

なお、酵素活性は、各基質で定めた波長における吸光度を、1分間で1増加させる酵素量を1単位（U；ユニット）として定義した。

直接的酸化反応の結果を、比活性で表6に示す。

表 6

基質	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質)	
		フェノールオキシダーゼ I pH6. 5	pH9. 0
ジアミン化合物			
オルト-フェニレンジアミン	430	6. 2	0. 4
パラ-フェニレンジアミン	470	5. 0	0. 8
N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン	470	15. 9	0. 4
トリレン-3, 4-ジアミン	470	3. 0	0. 3
パラ-アミノジフェニルアミン	470	2. 9	0. 4
2-クロロ-1, 4-フェニレンジアミン	450	7. 8	0. 2
2, 5-ジアミノトルエン	470	4. 3	0. 2
アミノフェノール化合物			
オルト-アミノフェノール	450	20. 9	2. 9
パラ-アミノフェノール	405	7. 2	0. 1
5-アミノ-2-メチルフェノール	405	0. 5	0. 1
フェノール化合物			
2-メトキシフェノール	450	8. 1	0. 3
2, 6-ジメトキシフェノール	470	33. 9	0. 1
カテコール	405	2. 1	0. 2
プロトカテキ酸	405	0. 5	0. 0
ナフトール化合物			
1-ナフトール	405	0. 9	0. 4
1, 3-ジヒドロキシナフトール	450	20. 9	6. 0
1, 5-ジヒドロキシナフトール	470	2. 9	1. 0
インドール化合物			
4-ヒドロキシインドール	405	3. 2	0. 6
5-ヒドロキシインドール	405	1. 1	0. 1
その他の化合物			
カテキン(緑茶抽出物)	405	0. 8	0. 2
リグニナルカリ抽出物(稲由来)	450	2. 5	0. 4
リグニナルカリ抽出物(針葉樹由来)	450	1. 9	1. 8

表 6 続き

基質	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質)	
		フェノールキナーゼ II	
		pH6.5	pH9.0
ジアミン化合物			
オルト-フェニレンジアミン	430	7.2	0.2
パラ-フェニレンジアミン	470	5.5	0.3
N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン	470	23.5	0.3
トリレン-3, 4-ジアミン	470	4.4	0.4
パラ-アミノジフェニルアミン	470	6.0	0.3
2-クロロ-1, 4-フェニレンジアミン	450	6.2	0.2
2, 5-ジアミノトルエン	470	5.7	0.1
アミノフェノール化合物			
オルト-アミノフェノール	450	31.3	2.1
パラ-アミノフェノール	405	8.7	0.1
5-アミノ-2-メチルフェノール	405	0.5	0.1
フェノール化合物			
2-メトキシフェノール	450	5.9	0.3
2, 6-ジメトキシフェノール	470	56.4	0.1
カテコール	405	1.9	0.1
プロトカテク酸	405	0.8	0.0
ナフトール化合物			
1-ナフトール	405	0.7	0.2
1, 3-ジヒドロキシナフトール	450	18.7	1.9
1, 5-ジヒドロキシナフトール	470	4.2	0.3
インドール化合物			
4-ヒドロキシインドール	405	5.1	0.4
5-ヒドロキシインドール	405	2.6	0.1
その他の化合物			
カテキン(緑茶抽出物)	405	0.6	0.2
リグニンアルカリ抽出物(稲由来)	450	1.3	0.5
リグニンアルカリ抽出物(針葉樹由来)	450	1.1	2.4

表 6 続き

基質	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質)	
		フェノールオキシダーゼ III pH6.5	pH9.0
ジアミン化合物			
オルト-フェニレンジアミン	430	8.7	0.2
パラ-フェニレンジアミン	470	7.0	0.2
N,N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン	470	3.6	0.0
トリレン-3,4-ジアミン	470	0.8	0.0
パラ-アミノジフェニルアミン	470	2.9	0.0
2-クロロ-1,4-フェニレンジアミン	450	10.1	0.0
2,5-ジアミノトルエン	470	5.2	0.0
アミノフェノール化合物			
オルト-アミノフェノール	450	24.1	2.3
パラ-アミノフェノール	405	10.4	0.0
5-アミノ-2-メチルフェノール	405	1.4	0.0
フェノール化合物			
2-メトキシフェノール	450	2.0	0.2
2,6-ジメトキシフェノール	470	63.3	0.2
カテコール	405	4.4	0.0
プロトカテク酸	405	2.1	0.9
ナフトール化合物			
1-ナフトール	405	0.7	0.1
1,3-ジヒドロキシナフトール	450	15.5	1.9
1,5-ジヒドロキシナフトール	470	2.8	0.0
インドール化合物			
4-ヒドロキシインドール	405	3.8	0.0
5-ヒドロキシインドール	405	2.6	0.0
その他の化合物			
カテキン(緑茶抽出物)	405	0.7	0.0
リグニンアルカリ抽出物(稲由来)	450	3.3	0.0
リグニンアルカリ抽出物(針葉樹由来)	450	3.7	0.0

表 6 続き

基質	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質)	
		pH6.5	pH9.0
ジアミン化合物			
オルト-フェニレンジアミン	430	0.6	0.0
パラ-フェニレンジアミン	470	3.4	0.5
N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン	470	42.4	2.8
トリレン-3, 4-ジアミン	470	0.6	0.1
パラ-アミノジフェニルアミン	470	15.4	1.2
2-クロロ-1, 4-フェニレンジアミン	450	2.6	0.0
2, 5-ジアミノトルエン	470	3.2	0.1
アミノフェノール化合物			
オルト-アミノフェノール	450	1.8	9.3
パラ-アミノフェノール	405	0.5	0.2
5-アミノ-2-メチルフェノール	405	0.1	0.1
フェノール化合物			
2-メトキシフェノール	450	0.0	0.4
2, 6-ジメトキシフェノール	470	0.4	1.7
カテコール	405	0.3	0.2
プロトカテク酸	405	0.6	0.6
ナフトール化合物			
1-ナフトール	405	0.1	1.0
1, 3-ジヒドロキシナフトール	450	12.6	16.7
1, 5-ジヒドロキシナフトール	470	3.3	5.1
インドール化合物			
4-ヒドロキシインドール	405	1.8	2.7
5-ヒドロキシインドール	405	0.1	0.1
その他の化合物			
カテキン(緑茶抽出物)	405	0.6	1.4
リグニンアルカリ抽出物(稲由来)	450	0.6	1.6
リグニンアルカリ抽出物(針葉樹由来)	450	3.5	3.8

その結果、表 6 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、中性条件 (pH 6.5) 下で、ジアミン化合物、アミノフェノール化合物、フェノール化合物等の様々な基質の酸化反応を強く触媒した。

また、中性フェノールオキシダーゼ I は、以下に示すような基質特異性を示した：

- 1) ジアミン化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、N, N-ジメチル-パラ

ーフェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒した。

2) アミノフェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、オルトーアミノフェノールの酸化反応を強く触媒した。

3) フェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応を強く触媒した。

4) ナフトール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、1,3-ジヒドロキシナフタレンの酸化反応を強く触媒した。

5) インドール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

6) その他の化合物(抽出物)を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性(pH 6.5)条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

さらに、中性フェノールオキシダーゼIは、中性(pH 6.5)条件下とアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性を比較した場合、様々な基質において、中性(pH 6.5)条件下での比活性のほうが、アルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性よりも高いことがわかった。

また、中性フェノールオキシダーゼIは、リグニンアルカリ抽出物(針葉樹由来)を基質とした場合、中性(pH 6.5)条件下でも強い触媒活性を示したが、アルカリ性(pH 9.0)条件下でも同等の強い触媒活性がみられた。

また、ミロセシウム属菌類由来ピリルビンオキシダーゼは、中性(pH 6.5)条件下での比活性とアルカリ性(pH 9.0)条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物及びカテコール以外の基質では、中性(pH 6.5)条件下での比活性よりも

アルカリ性 (pH 9.0) 条件下での比活性が高く、前記中性フェノールオキシダーゼ I とは大きく異なっていることがわかった。

中性フェノールオキシダーゼ I I は、以下に示すような基質特異性を示した：

- 1) ジアミン化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、N, N-ジメチルパラフェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒した。
- 2) アミノフェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、オルト-アミノフェノールの酸化反応を強く触媒した。
- 3) フェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、2, 6-ジメトキシフェノールの酸化反応を強く触媒した。
- 4) ナフトール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。この中でも特に、1, 3-ジヒドロキシナフタレンの酸化反応を強く触媒した。
- 5) インドール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。
- 6) その他の化合物 (抽出物) を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性 (pH 6.5) 条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

さらに、中性フェノールオキシダーゼ I I は、中性 (pH 6.5) 条件下での比活性とアルカリ性 (pH 9.0) 条件下での比活性とを比較した場合、リグニンアルカリ抽出物 (針葉樹由来) を基質とした場合以外は、様々な基質において、中性 (pH 6.5) 条件下での比活性のほうが、アルカリ性 (pH 9.0) 条件下での比活性よりも高いことがわかった。

また、中性フェノールオキシダーゼ I I は、リグニンアルカリ抽出物（針葉樹由来）を基質とした場合、中性（pH 6.5）条件下でも強い触媒活性を有していたが、アルカリ性（pH 9.0）条件下でさらに強い触媒活性がみられた。

一方、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼは、中性（pH 6.5）条件下での比活性とアルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物及びカテコール以外の基質では、中性（pH 6.5）条件下での比活性よりもアルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性が高く、中性フェノールオキシダーゼ I I とは大きく異なっていることがわかった。

また、中性フェノールオキシダーゼ I I I は、以下に示すような基質特異性を示した。

(1) ジアミン化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性（pH 6.5）条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、2-クロロ-1,4-フェニレンジアミンの酸化反応を強く触媒した。

(2) アミノフェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性（pH 6.5）条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、オルト-アミノフェノールの酸化反応を強く触媒した。

(3) フェノール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性（pH 6.5）条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、2,6-ジメトキシフェノールの酸化反応を強く触媒した。

(4) ナフトール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性（pH 6.5）条件下で、基質の酸化反応を触媒した。なかでも、特に、1,3-ジヒドロキシナフタレンの酸化反応を強く触媒した。

(5) インドール化合物を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中性（pH 6.5）条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

(6) その他の化合物（抽出物）を基質とした場合、いずれの基質に対しても、中

性（pH 6.5）条件下で、基質の酸化反応を触媒した。

さらに、中性フェノールオキシダーゼ I I I は、中性（pH 6.5）条件下とアルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性を比較した場合、中性（pH 6.5）条件下での比活性のほうが、アルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性よりも高いことがわかった。

一方、ミロセシウム属菌類由来ピリルピンオキシダーゼは、中性（pH 6.5）条件下での比活性とアルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性とを比較した場合、ジアミン化合物及びカテコール以外の基質では、中性（pH 6.5）条件下での比活性よりもアルカリ性（pH 9.0）条件下での比活性が高く、中性フェノールオキシダーゼ I I I とは大きく異なっていることがわかった。

前記フラムリナ ベルティペス [*Flammulina velutipes*] I F O 3 0 6 0 1 株の中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I によれば、所望の基質に対する反応に応じて反応 pH 条件を変更することなく、中性条件下で様々な基質を効率よく酸化させることができる。これにより、環境、人体等に対する影響が少ない温和な条件下での反応が可能であり、前記中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、接着剤の製造、有機化合物の合成、染色、廃液処理、毒性化合物の解毒、木質の改善、合成版の製造、土壌の改良等の多方面への幅広い応用が期待される。

実施例 10 中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I それぞれの脱色活性

前記実施例 1 の（5）で得られた中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び前記実施例 1 の（7）で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I

I について、種々の染料に対する脱色活性を、染料が持つ紫外可視吸収スペクトルの極大値の変化により測定した。

詳細には、前記前記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I を含む酵素水溶液 0.8 ml に 1.0 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.1 ml を添加し、得られた混合物に、0.2 mg/ml 染料水溶液 0.1 ml を混合した。ついで、得られた混合物について、紫外可視分光光度計 (島津図製作所社製、商品名: UV-2450) を用いて、吸光度の変化を測定し、酵素活性 (脱色活性) を調べた。

前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I について、種々の染料に対する脱色活性を、染料が持つ紫外可視吸収スペクトルの極大値の変化により測定した。

詳細には、前記実施例 1 の (7) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I I I の画分 0.005 ml と、蒸留イオン交換水 0.395 ml と、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.5 ml と、0.2 mg/ml 染料水溶液 0.1 ml とを十分混合し、得られた混合物について紫外可視分光光度計 [島津製作所社製、商品名: UV-2450] を用いて吸光度の変化を測定し、酵素活性 (脱色活性) を調べた。

なお、酵素活性は、吸光度を、1 分間で 1 増加させる酵素活性を 1 単位 (U ; ユニット) として定義した。比較のために、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼについても、同様に、脱色活性を調べた。

各染料の測定波長及び脱色活性の結果を、比活性で表 7 に示す。

表 7

染料	測定波長 (nm)	比活性 (U/mg タンパク質) 中性フェノールオキシダーゼ			
		I	II	III	ミロセシウム属菌類由来 ビリルビンオキシダーゼ
ナチュラルオレンジ 6	450	-0.06	0.04	0.00	0.01
アシッドオレンジ 8	480	0.14	0.19	0.00	-0.27
アシッドバイオレット 17	550	-0.17	-0.12	0.55	0.09
レマゾールブリリアントブルー R	600	0.11	0.02	0.00	-0.06
エバンスブルー	630	-0.86	-0.23	-0.31	1.03
アシッドブルー 80	630	-0.50	-0.07	-0.31	-0.37

その結果、表 7 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ I は、ナチュラルオレンジ 6、アシッドバイオレット 17、エバンスブルー及びアシッドブルー 80 に対して、脱色活性を示した。

また、表 7 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ II は、アシッドバイオレット 17、エバンスブルー及びアシッドブルー 80 に対して、脱色活性を示した。

また、表 7 に示されるように、中性フェノールオキシダーゼ III は、エバンスブルー及びアシッドブルー 80 に対して、脱色活性を示した。

さらに、中性フェノールオキシダーゼ I は、中性フェノールオキシダーゼ II 及び中性フェノールオキシダーゼ III と比較して、ナチュラルオレンジ 6 に対する脱色活性が異なっていることがわかった。

また、中性フェノールオキシダーゼ III は、中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ II と比較して、アシッドバイオレット 17 に対する脱色活性が異なっていることがわかった。

一方、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼは、前記中性フェノールオキシダーゼ I とは、ナチュラルオレンジ 6、アシッドオレンジ 8、アシッドバイオレット 17、レマゾールブリリアントブルー R、エバンスブルーにおいて大きく異なっていた。

また、前記中性フェノールオキシダーゼ I I とは、アシッドオレンジ 8、アシッドバイオレット 17、レマゾールプリリアントブルー R、エバンスブルーにおいて大きく異なっていた。また、前記中性フェノールオキシダーゼ I I I とは、アシッドオレンジ 8、レマゾールプリリアントブルー R、エバンスブルーにおいて大きく異なっていた。

中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、中性条件下で染料を効率よく脱色することができる。これにより、前記中中性フェノールオキシダーゼ I、中性フェノールオキシダーゼ I I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I I は、廃液処理、脱色、洗濯時の色移り防止等の多方面への幅広い応用が期待される。

実施例 11 中性フェノールオキシダーゼ I 及び中性フェノールオキシダーゼ I I による染毛試験

上記実施例 1 の (5) で得られた中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I を用いた染毛試験は、パラフェニレンジアミンを染料として用いて、ヤク毛束及び羊毛布を酸化重合によって染色することにより行なった。

詳細には、染毛試験においては、染料としてパラフェニレンジアミン 0.5 g と、増粘剤としてヒドロキシエチルセルロース 0.75 g と、界面活性剤として硬化ヒマシ油 1.0 g と、高級アルコールとしてセタノール 0.25 g と、ミリスチルアルコール 0.25 g とを添加し、得られた混合物の pH を、乳酸 0.5 g とモノエタノールアミンとにより、7.0 に調整し、イオン交換水により重量を 50 g とすることにより得られた組成物を用いた。また、ヤク毛束 1 g と羊毛布 1 枚 (2 × 3 cm) に対して、この組成物を 2 g と、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I の酵素液を pH 7.0 においてパラフェニレンジアミンに対して合計 1.0 U になるように添加した混合物を塗布し、30℃で 1 時間保持した。

その結果、ヤク毛束及び羊毛布は、中性フェノールオキシダーゼ I 又は中性フェノールオキシダーゼ I I を用いることにより、黒く染色された。

産業上の利用可能性

本発明の中性フェノールオキシダーゼは、安定的に、種々の基質、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミン化合物に対して、中性付近の pH で効率よく反応させる際に用いられうる。また、本発明の中性フェノールオキシダーゼの生産方法によれば、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、効率よく、簡便に、安価に、かつ大量に得ることができる。さらに、本発明の抗体によれば、本発明の中性フェノールオキシダーゼを、簡便に、回収、精製できる。また、本発明の染色方法によれば、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物等による、簡便で、効率よい繊維や毛髪の色を可能にし、さらには、環境、人体等への影響を低減させることができる。さらに染色用組成物によれば、簡便で、効率のよい、繊維や毛髪の色を可能にし、さらには、環境、人体等への影響を低減させることができる。

請求の範囲

1. 以下の特性：

(1) 至適pH：5.0～7.0

(2) 基質特異性

i) N, N-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、オルト-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、1, 3-ジヒドロキシナフトール及び4-ヒドロキシインドールそれぞれの酸化による発色反応をpH 6.5付近で触媒する

ii) リグニンアルカリ抽出物の酸化的重合反応を触媒する
を有する中性フェノールオキシダーゼ。

2. 下記(3)～(7)：

(3) 28 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4) pH安定性：pH 8.0～9.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5) 至適温度：30～50℃

(6) 熱安定性：

I) 0℃～30℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II) 0℃～30℃において、pH 9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7) 等電点：約7.4

の特性、又は

下記(3')～(7')：

(3') 35 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4') pH安定性: pH 7.0~10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも75%の相対残存活性を維持する

(5') 至適温度: 30~60℃

(6') 熱安定性:

I') 0℃~50℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

II') 0℃~50℃において、pH 9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも70%の相対残存活性を有する

(7') 等電点: 約6.8

の特性、又は

下記(3'')~(7''):

(3'') 45 kDa (SDS-PAGE法により算出)

(4'') pH安定性: pH 8.0~10.0において、30℃で20時間のインキュベーション条件下、少なくとも70%の相対残存活性を維持する

(5'') 至適温度: 30~60℃

(6'') 熱安定性:

I'') 0℃~30℃において、pH 7.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも80%の相対残存活性を維持する

II'') 0℃~40℃において、pH 9.0で1時間のインキュベーション条件下、インキュベーション前の活性に対し、少なくとも90%の相対残存活性を維持する

(7'') 等電点: 約6.8

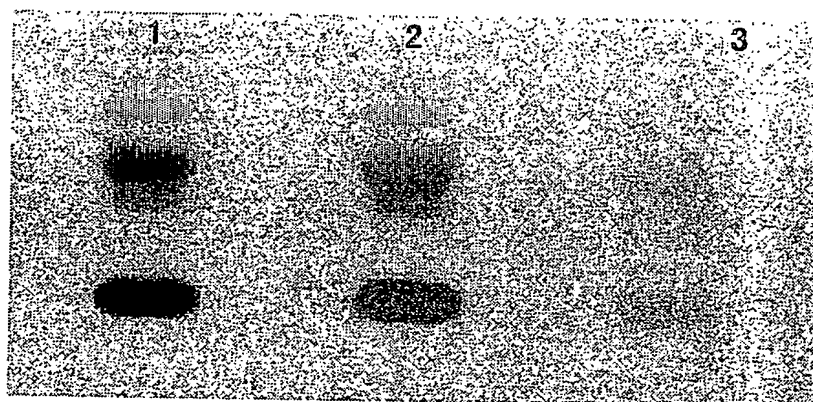
の特性

をさらに有する、請求項1記載の中性フェノールオキシダーゼ。

3. フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が生産する、請求項 1 又は 2 記載の中性フェノールオキシダーゼ。
4. フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌が、エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌である、請求項 1～3 いずれか 1 項に記載の中性フェノールオキシダーゼ。
5. エノキタケ〔フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕に属する担子菌が、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)〕 IFO30601 株である、請求項 1～4 いずれか 1 項に記載の中性フェノールオキシダーゼ。
6. フラムリナ (*Flammulina*) 属に属する担子菌を、pH 6.0～12.0 で培養することを特徴とする、中性フェノールオキシダーゼの生産方法。
7. 中性フェノールオキシダーゼが、請求項 1 又は 2 記載の中性フェノールオキシダーゼである、請求項 6 記載の生産方法。
8. 請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の中性フェノールオキシダーゼに対する抗体。
9. 請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の中性フェノールオキシダーゼを含有してなる染色用組成物。

10. 染料をさらに含有してなる、請求項9記載の染色用組成物。
11. 請求項1～5いずれか1項に記載の中性フェノールオキシダーゼの存在下に、染色対象物と染料とを接触させて、該染色対象物を染色することを特徴とする、染色方法。

図 1



- 1 : パラ-フェニレンジアミン
2 : 2,6-ジメトキシフェノール
3 : オルト-アミノフェノール

図 2

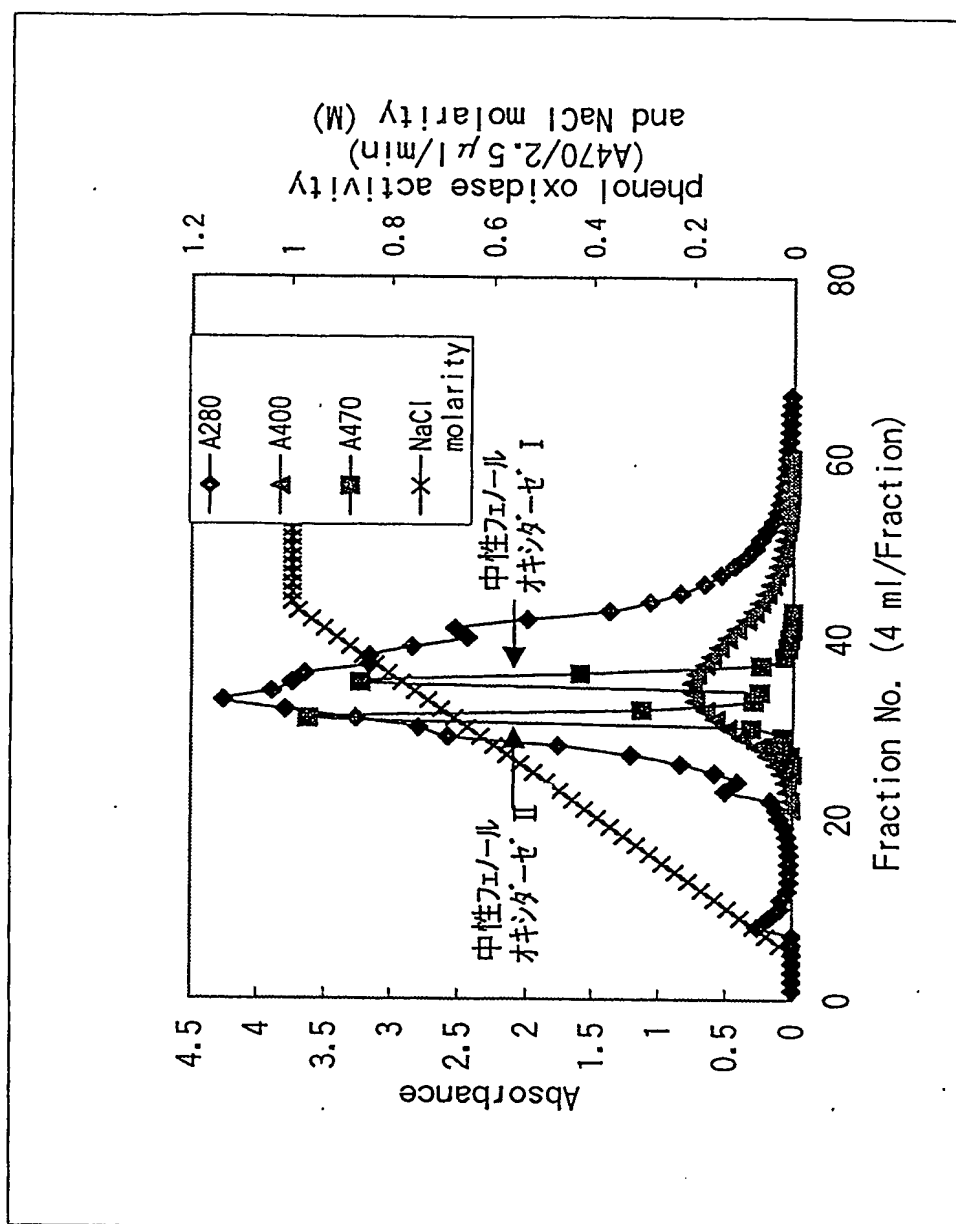


図 3

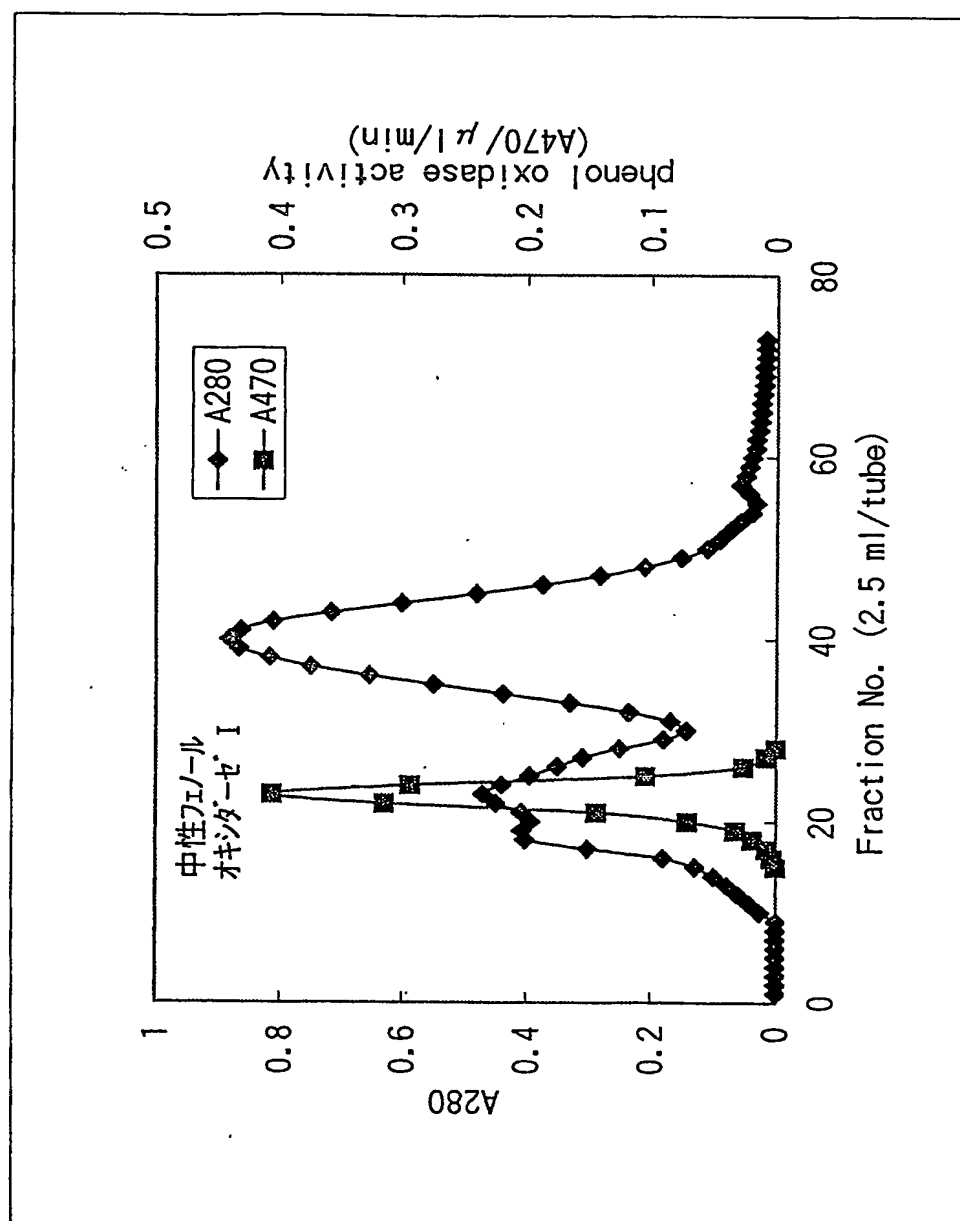


図 4

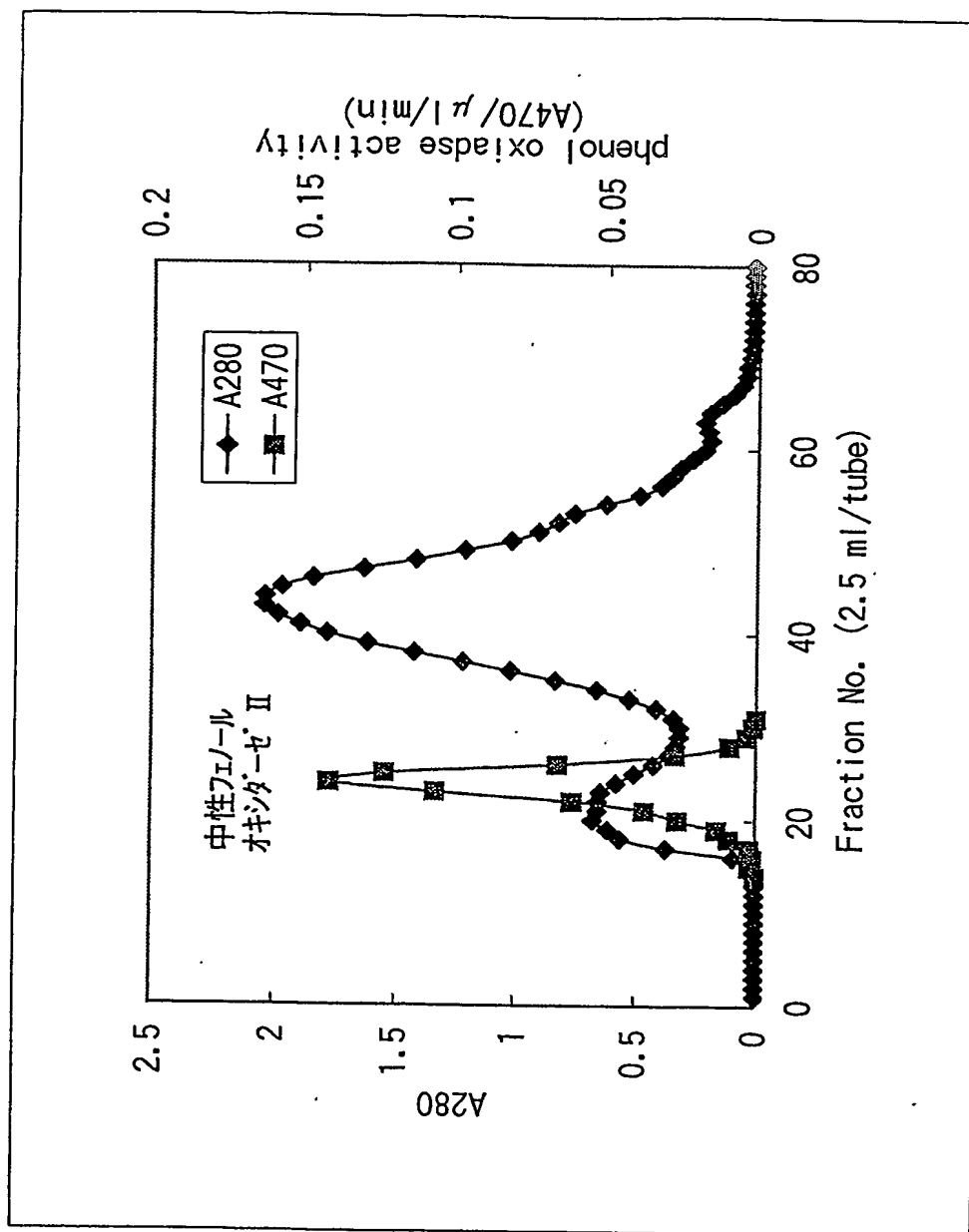


図 5

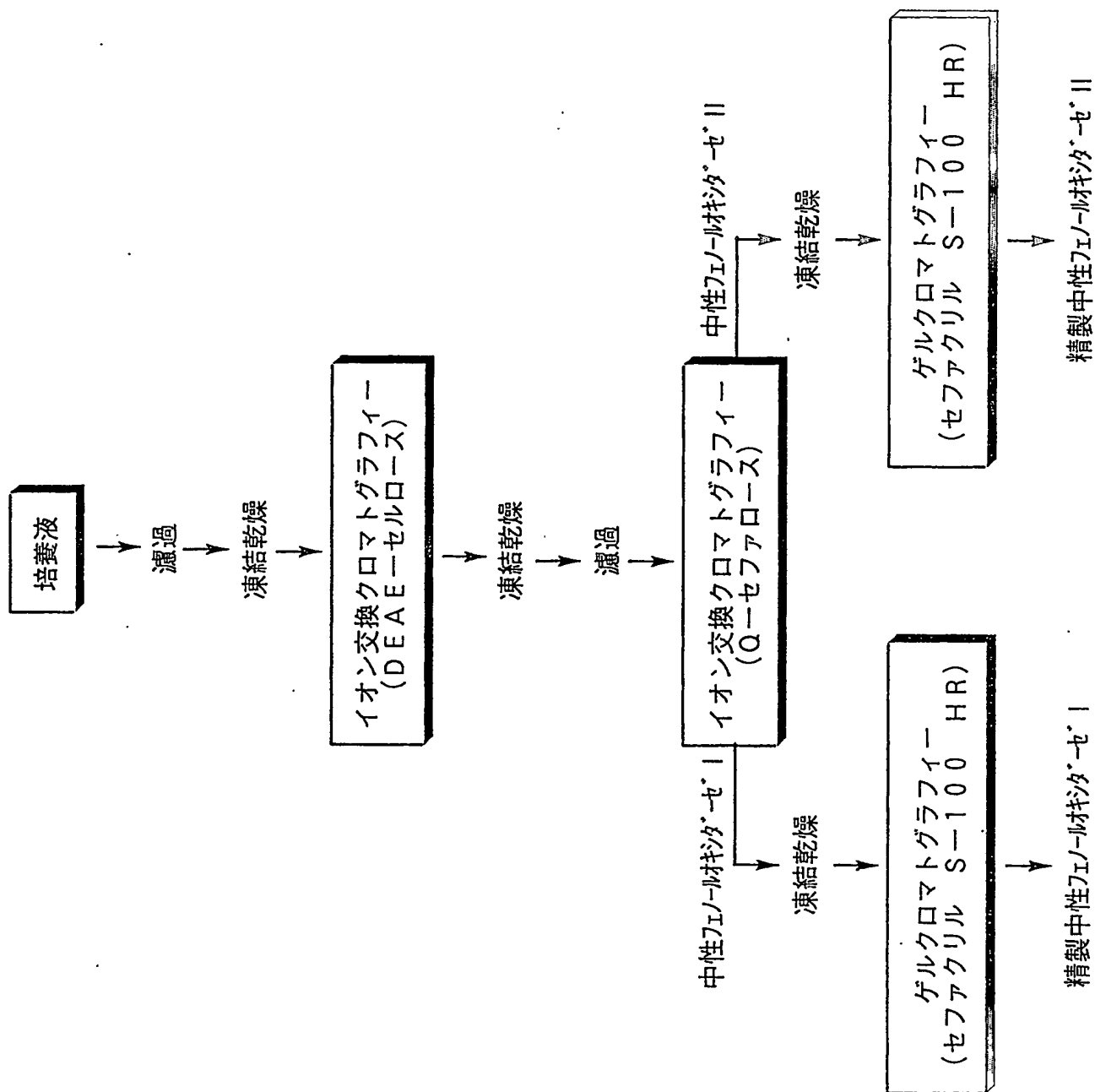


図 6

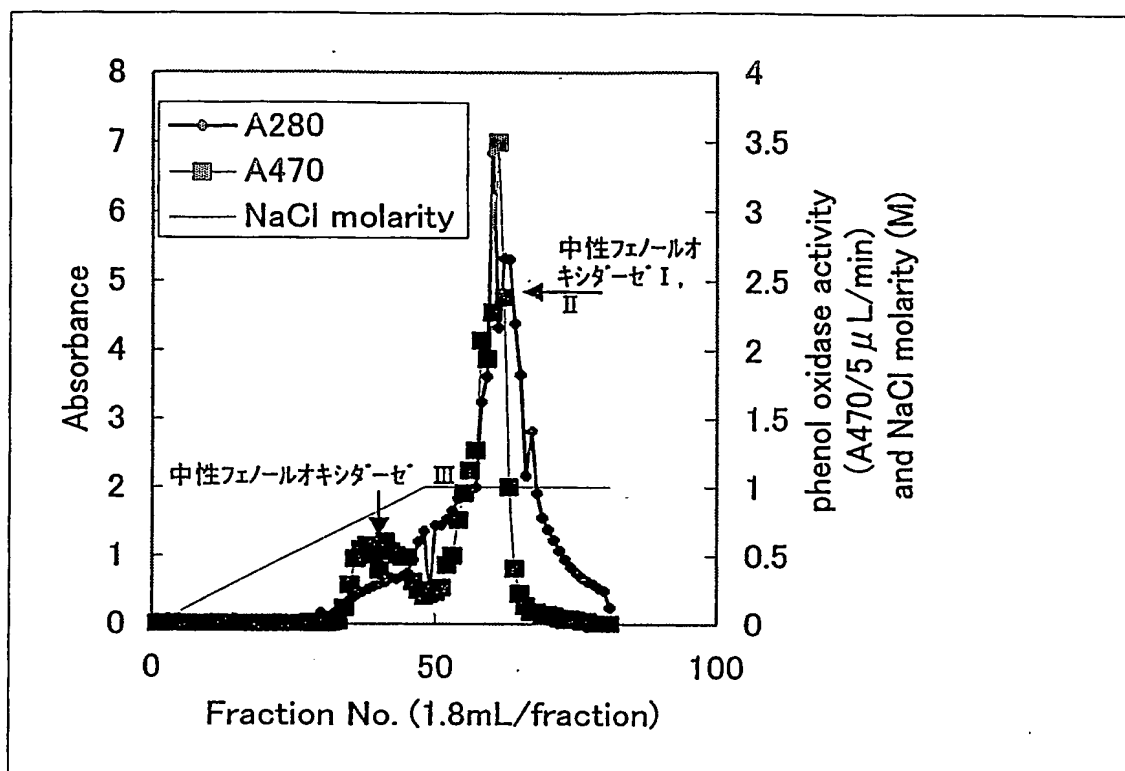


図 7

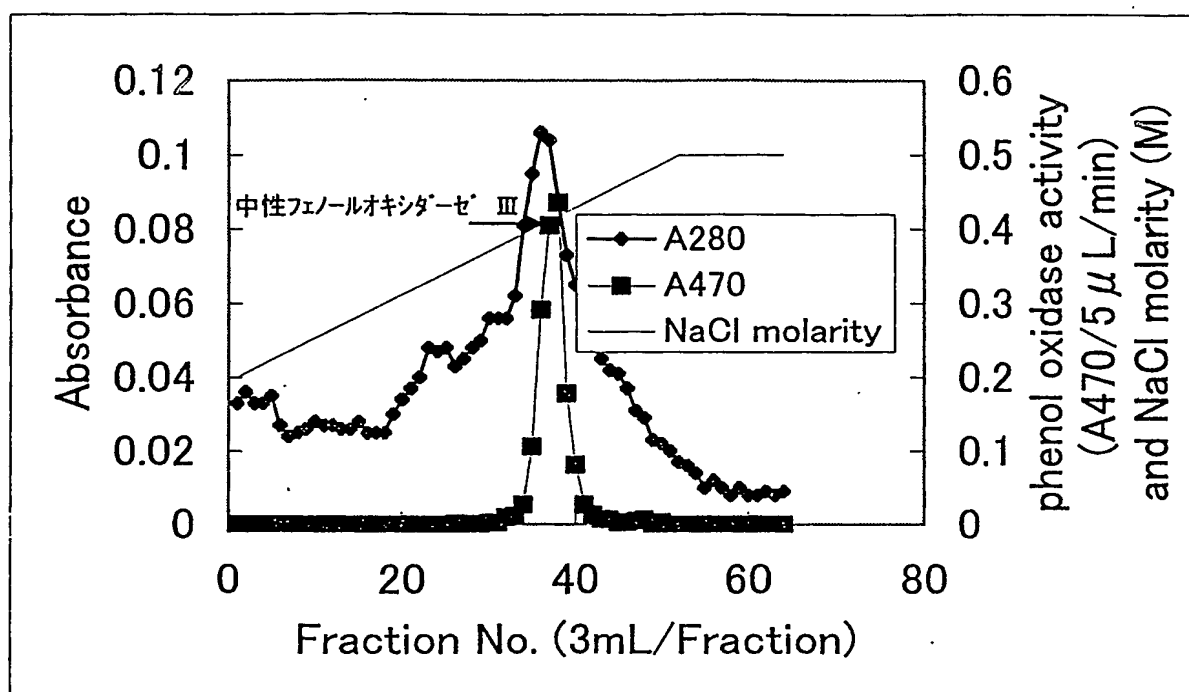


図 8

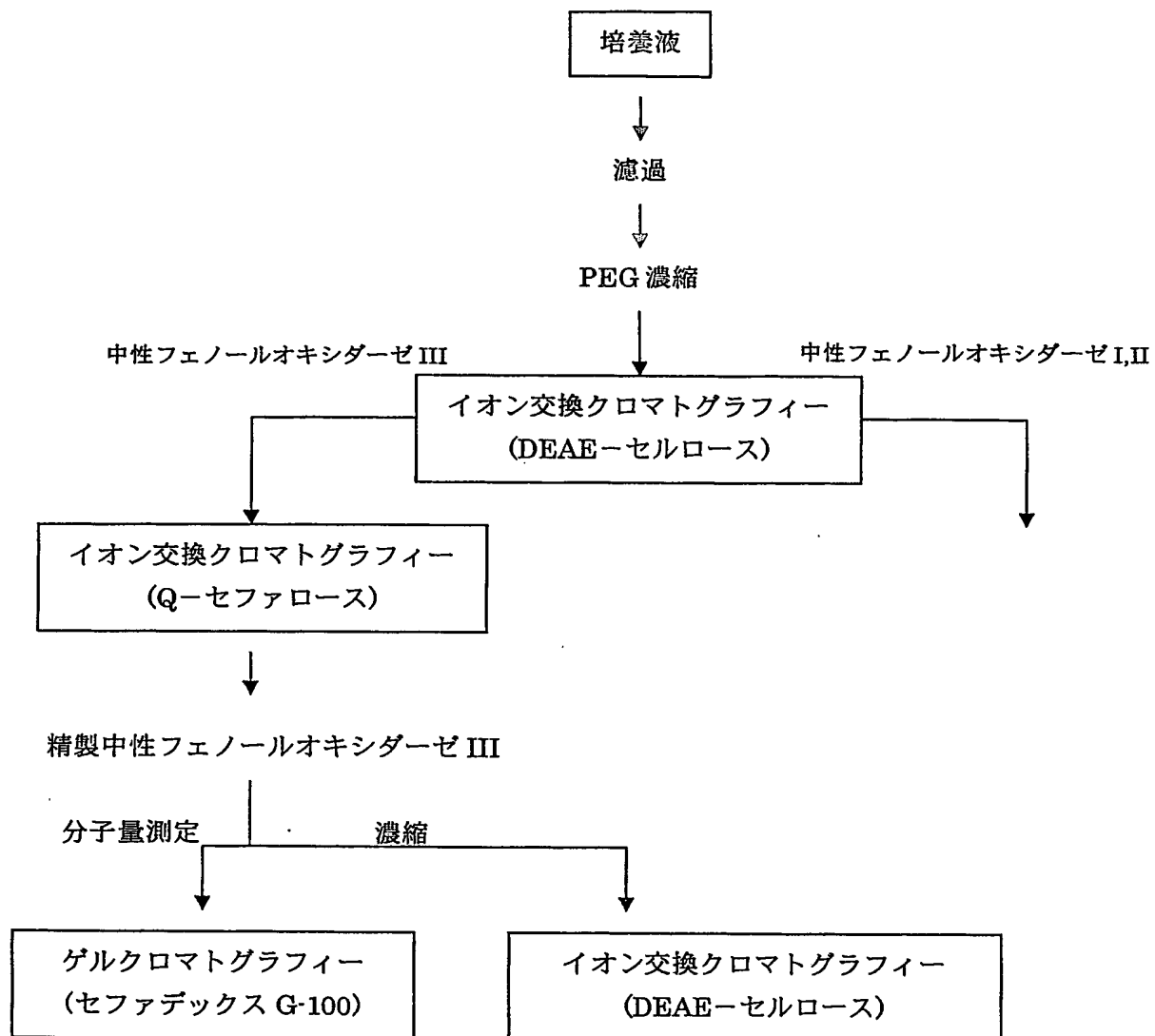


図 9

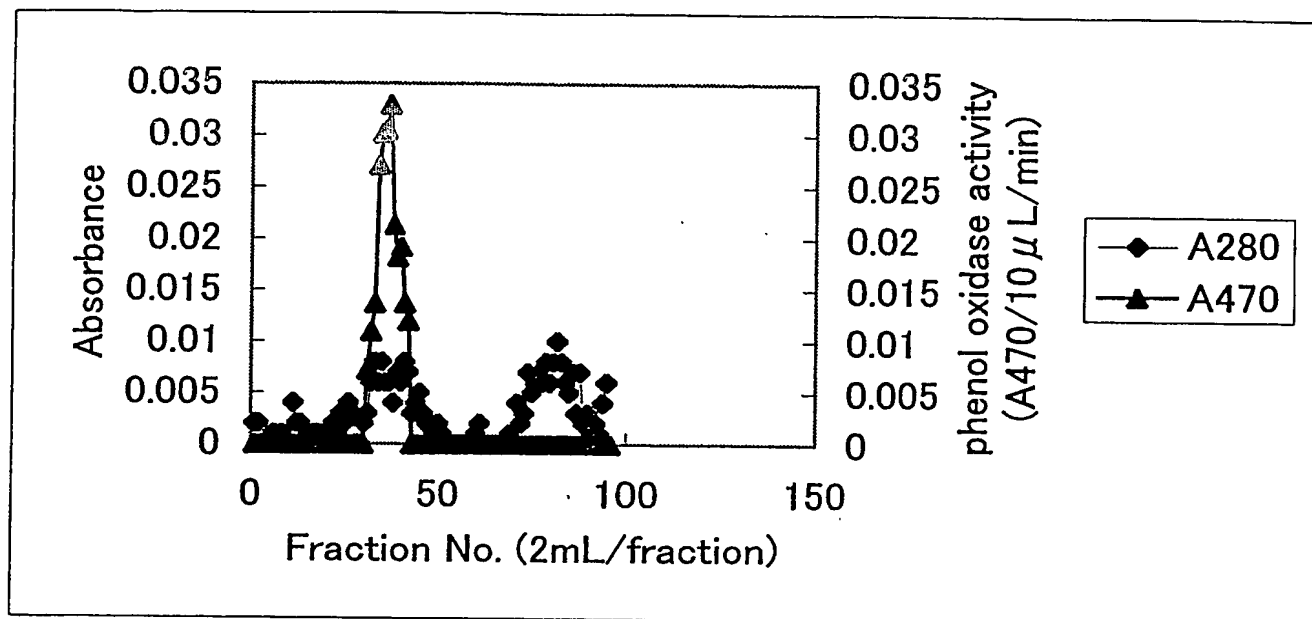
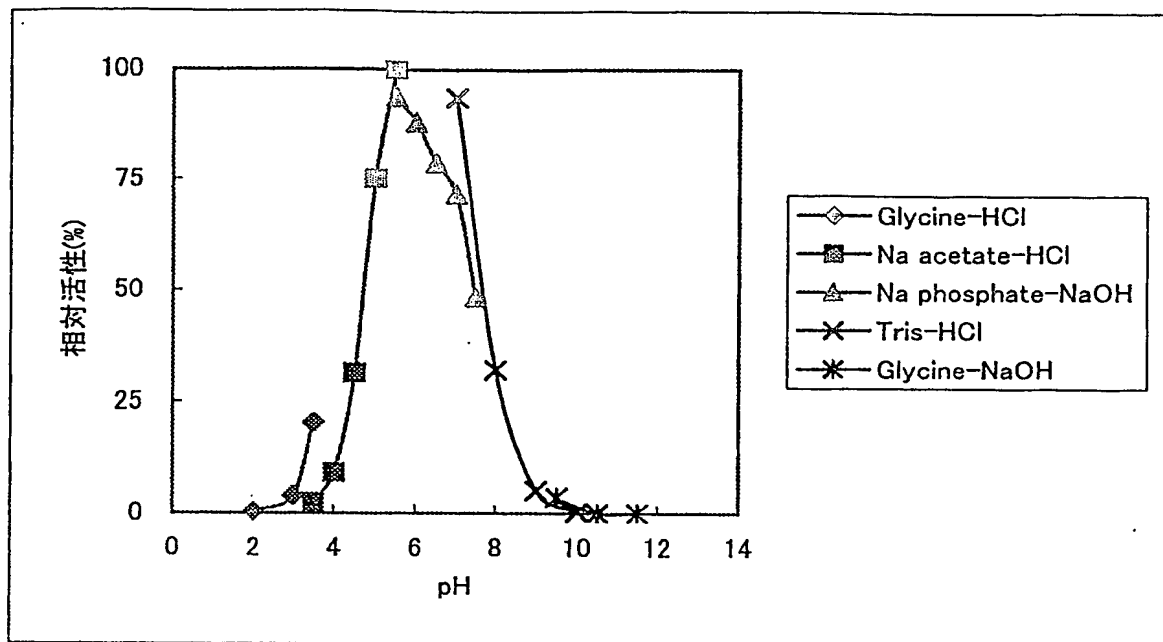


図 10-1

A



B

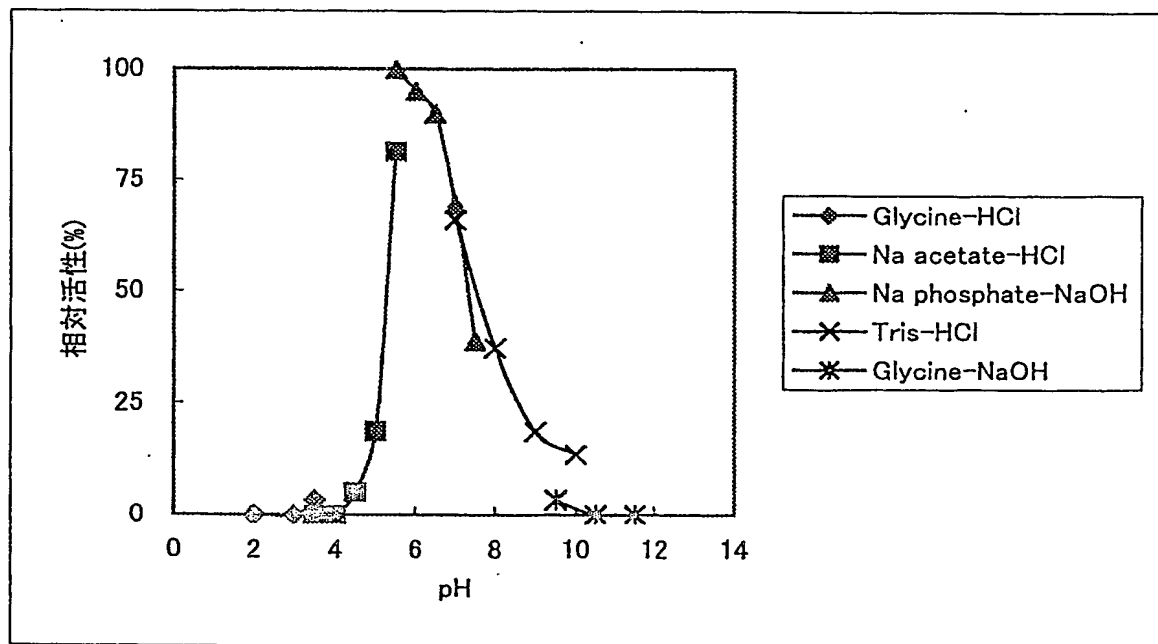
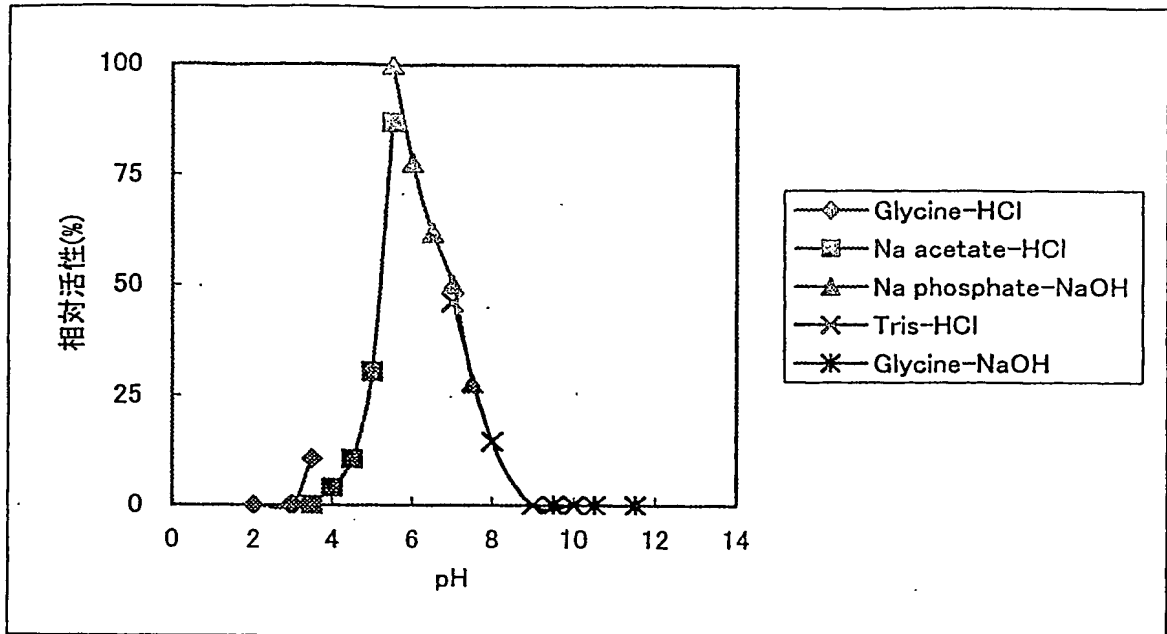


図 10-2

C



D

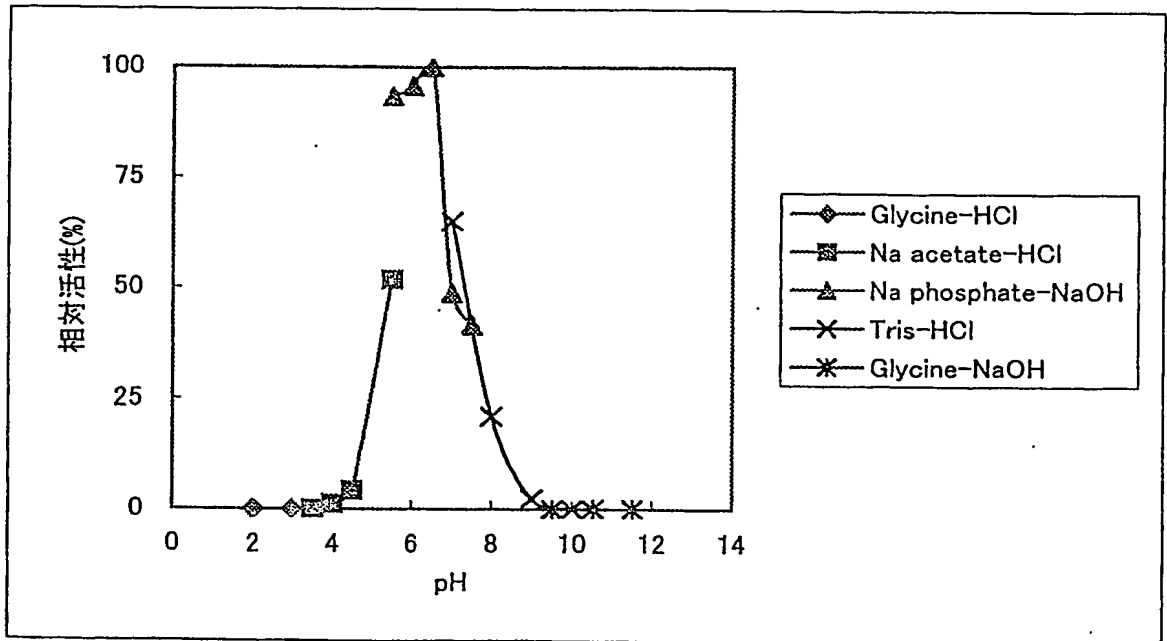
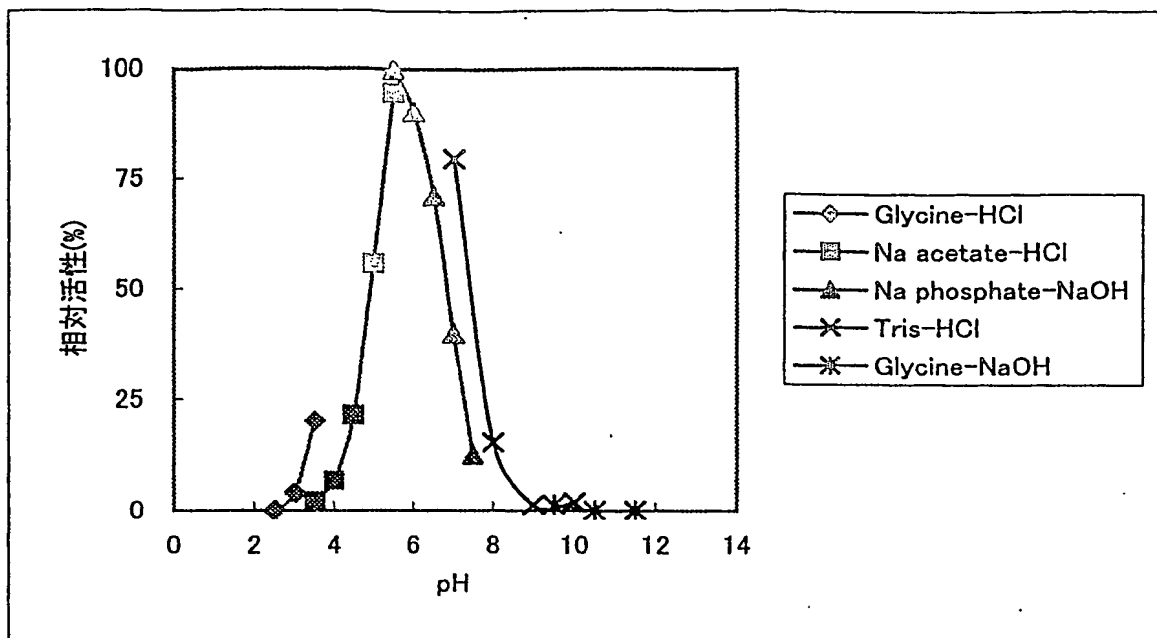


図 1 1 - 1

A



B

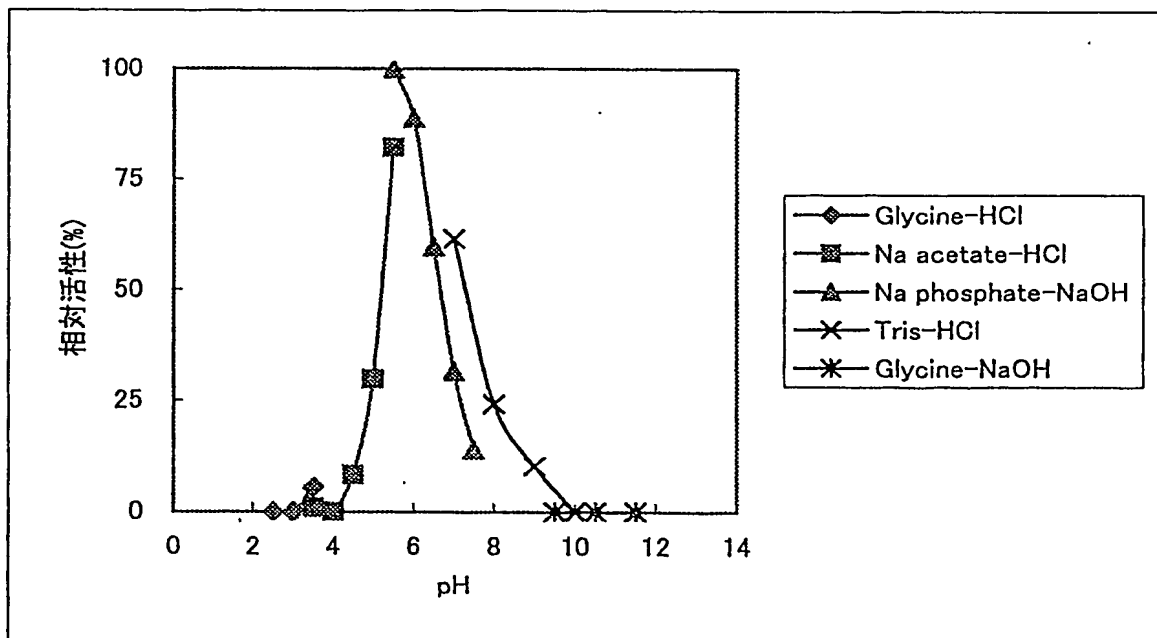
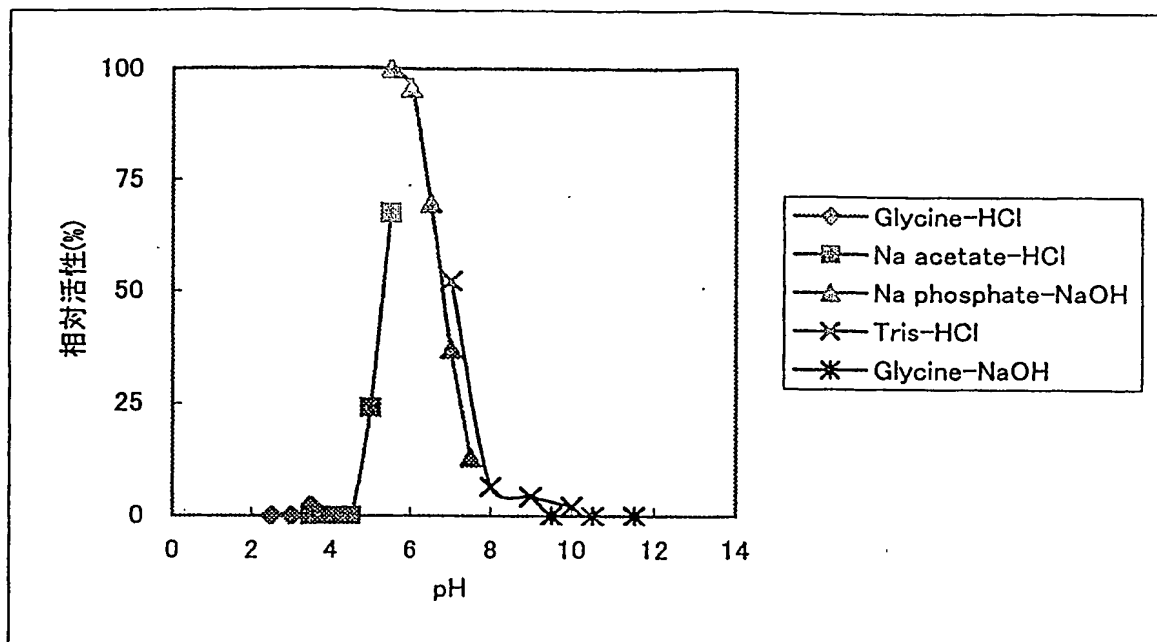


図 1 1 - 2

C



D

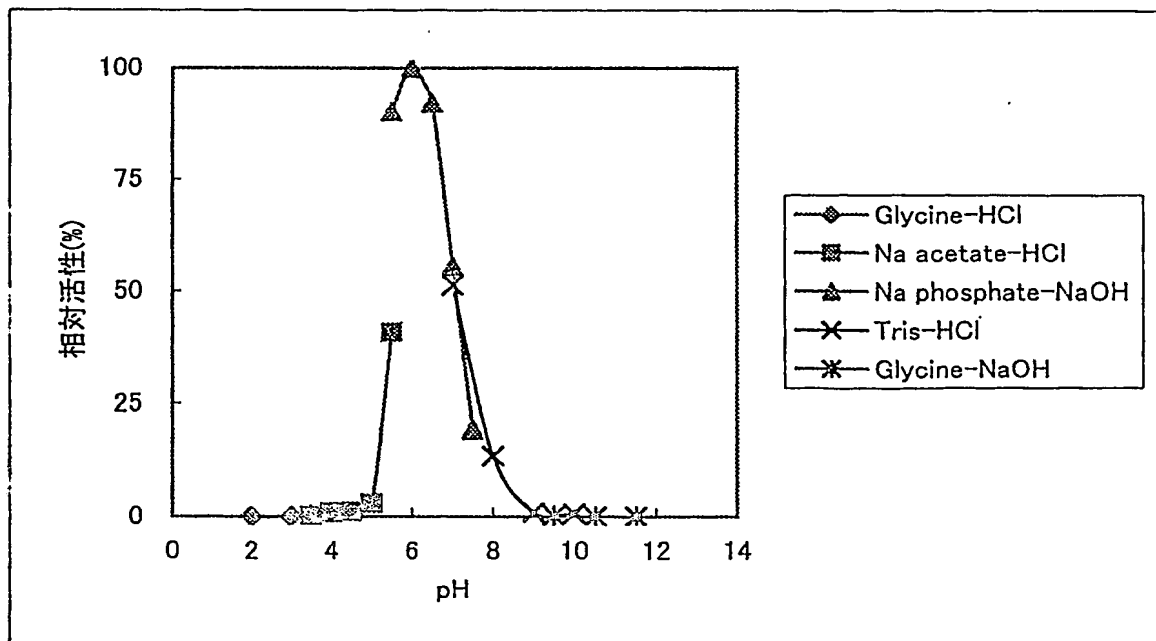


図 1 2 - 1

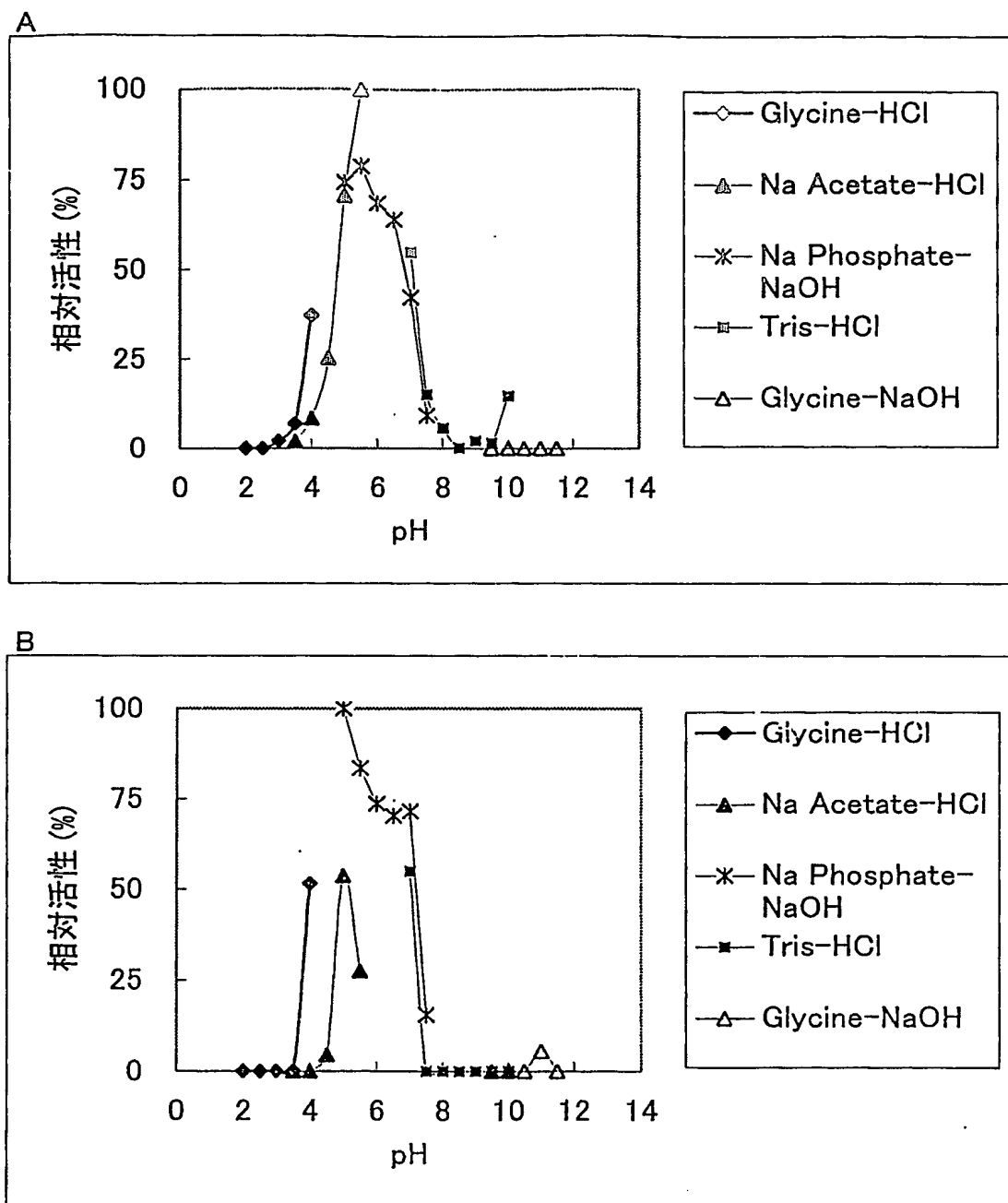


図 1 2 - 2

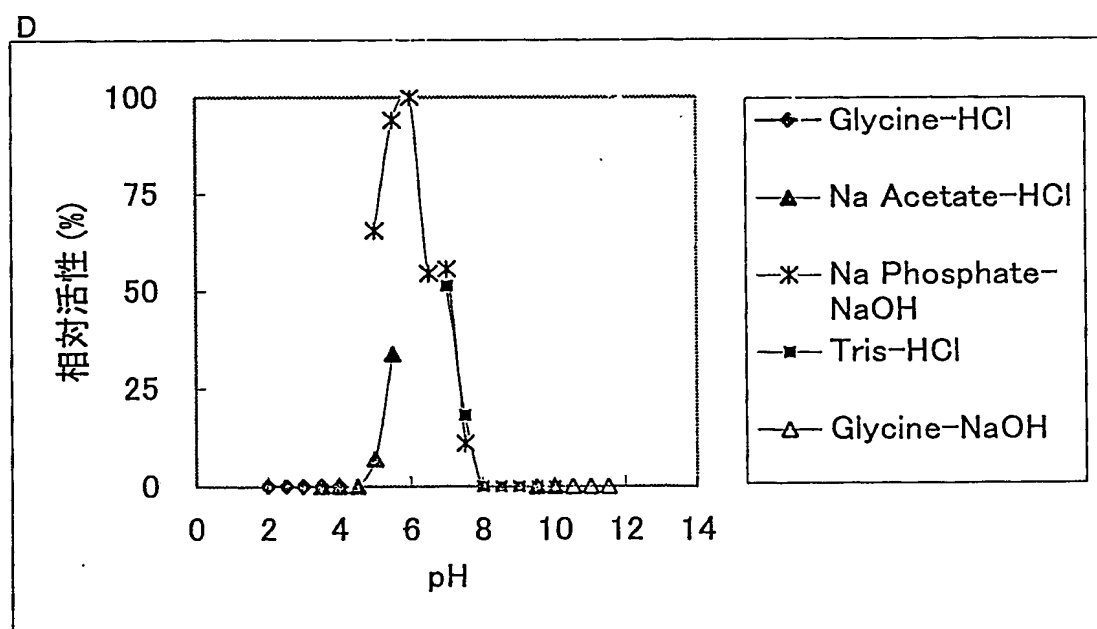
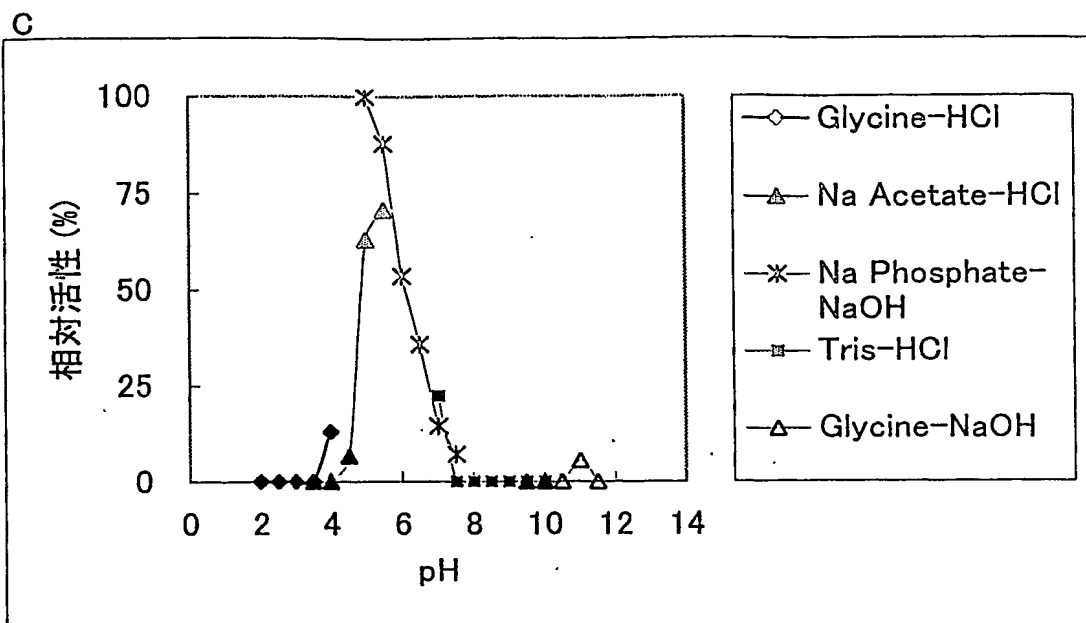
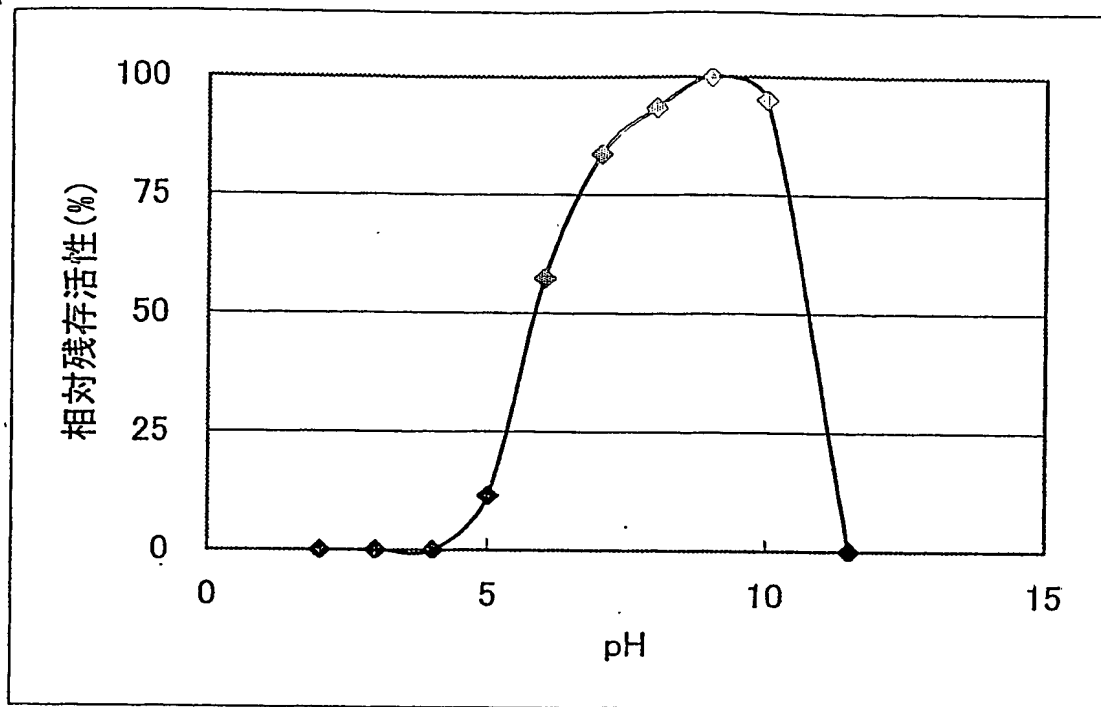


図 1 3 - 1

A



B

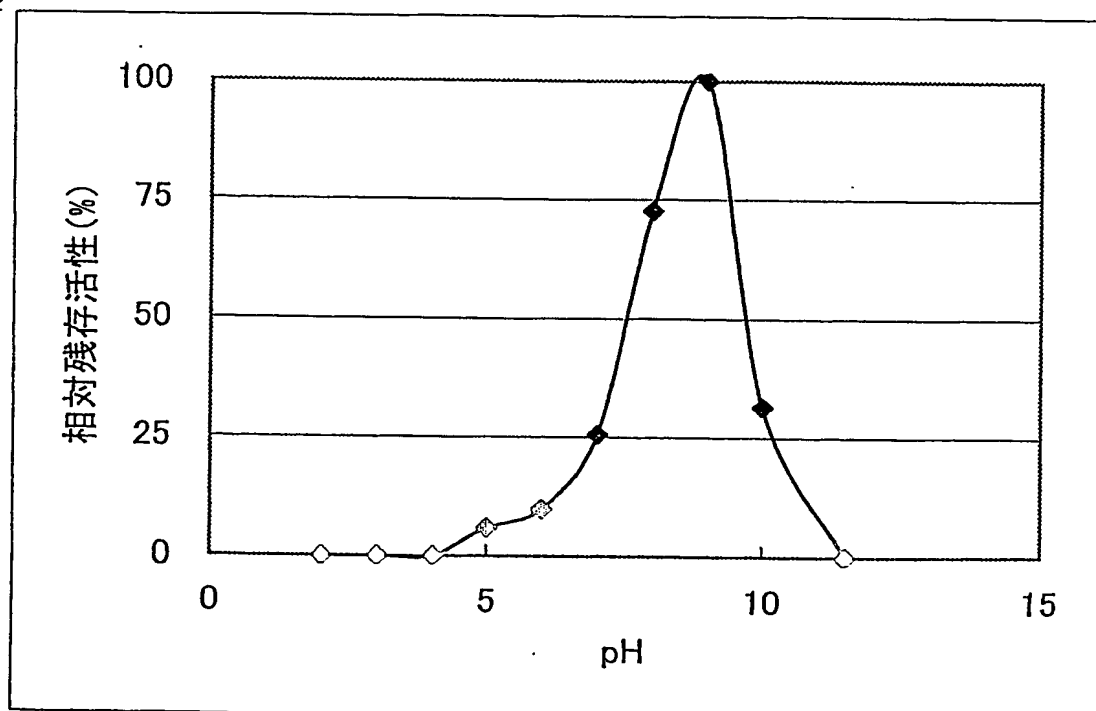
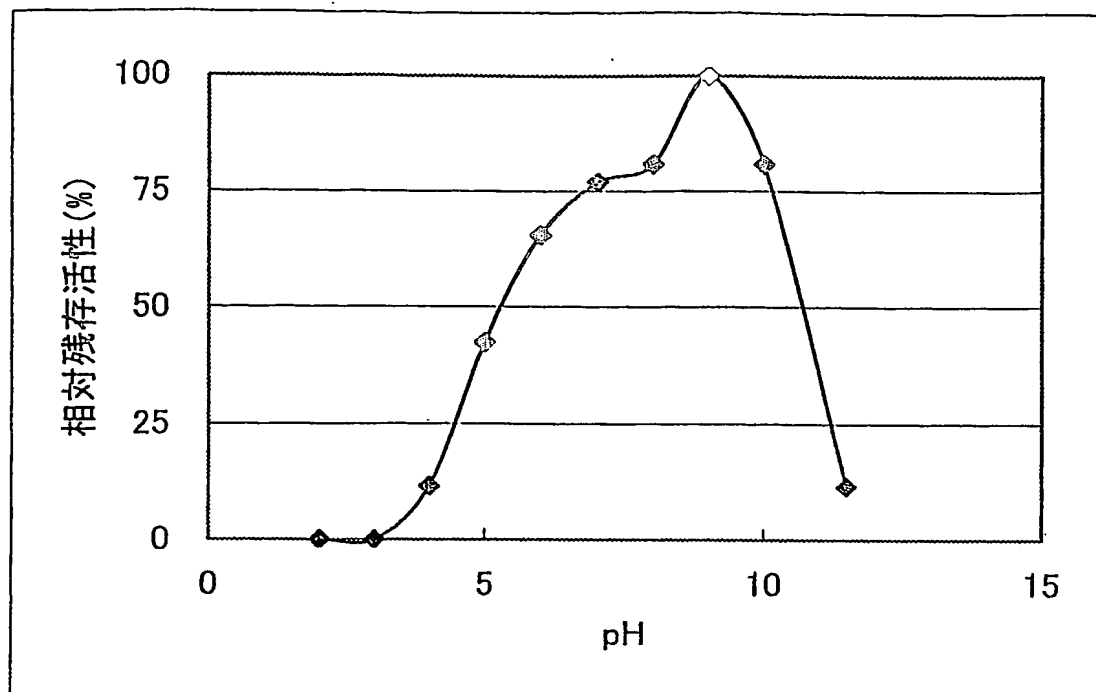


図 1 3 - 2

C



D

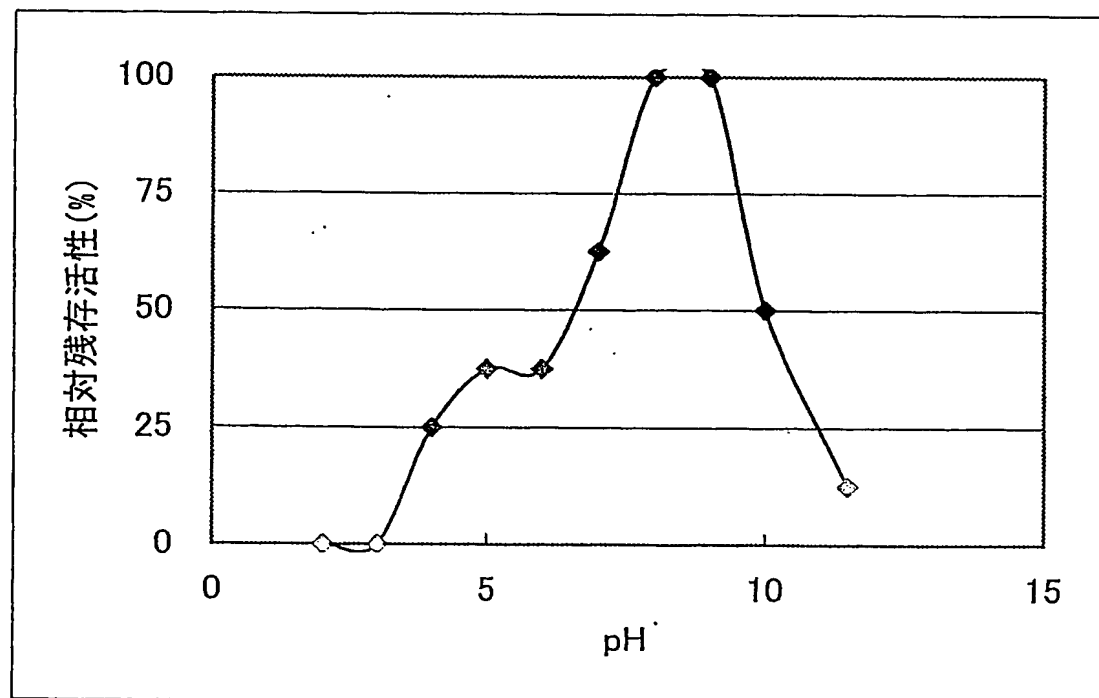


图 1 4 - 1

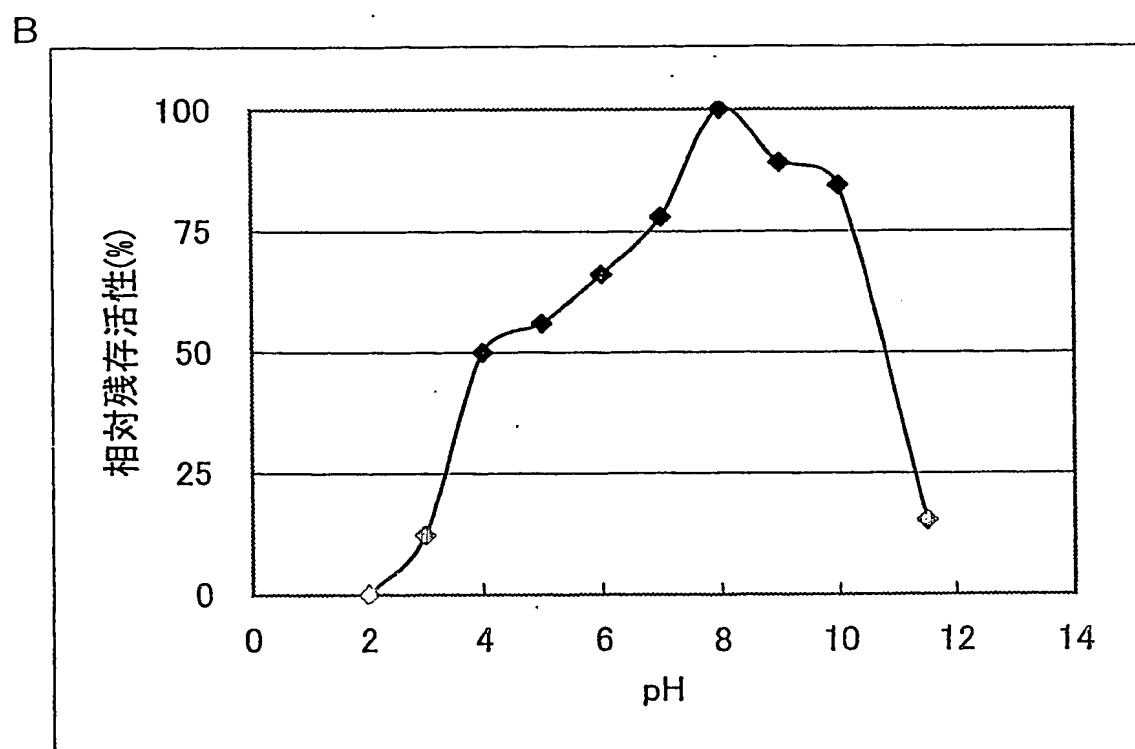
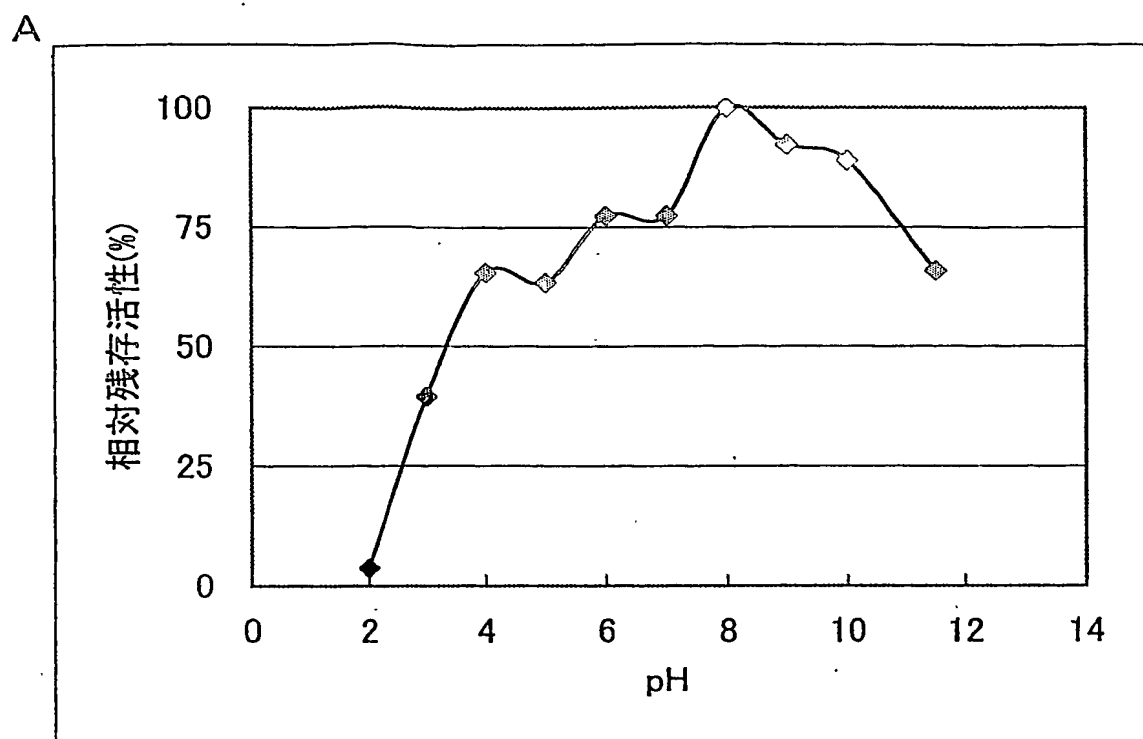
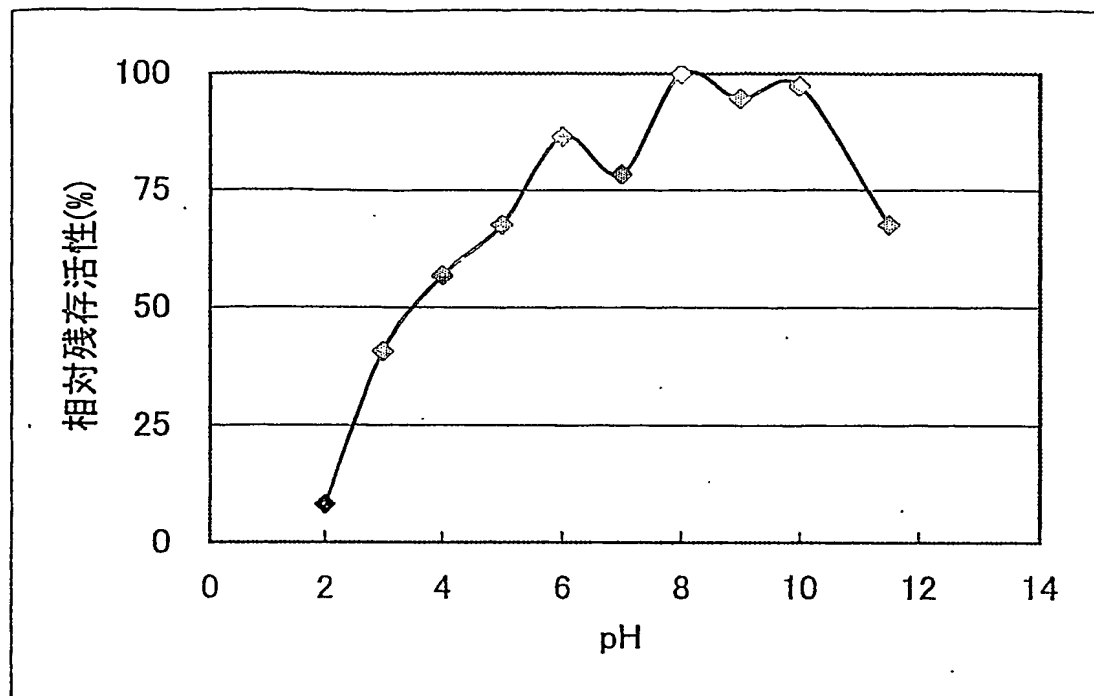


图 14-2

C



D

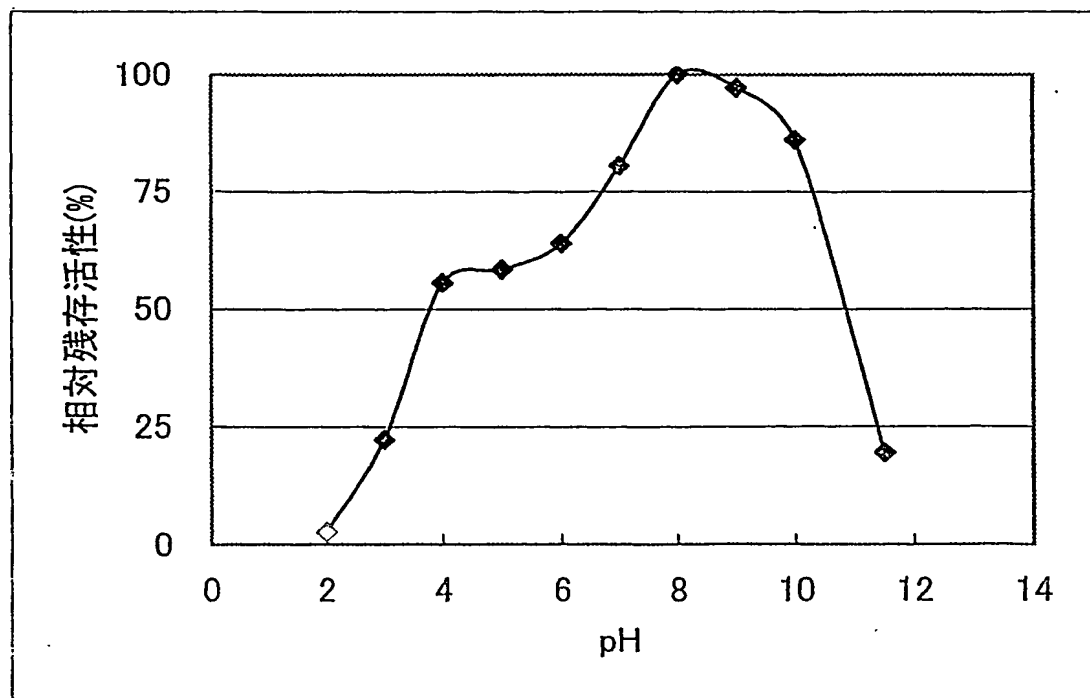


図 15-1

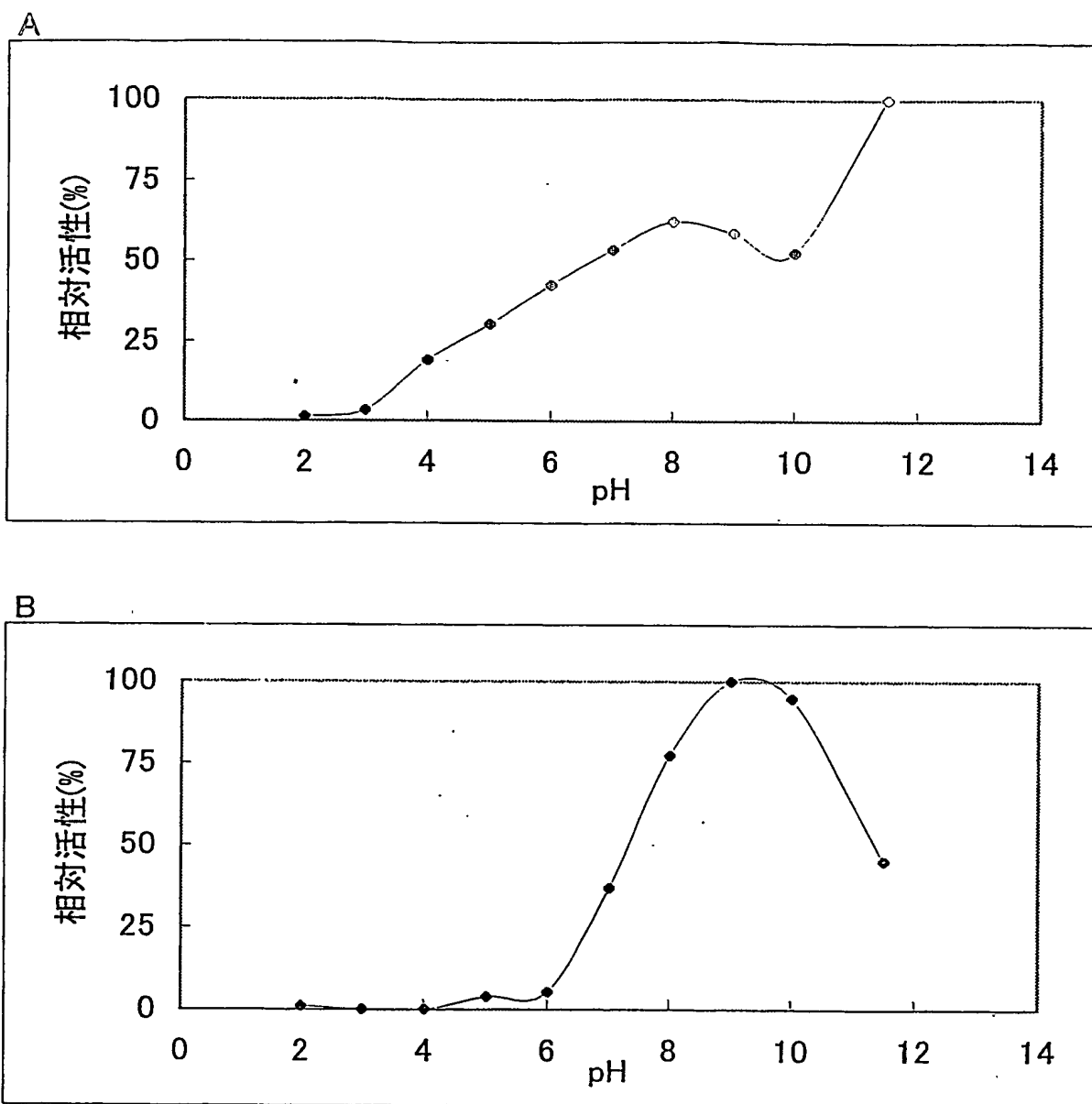


図 15-2

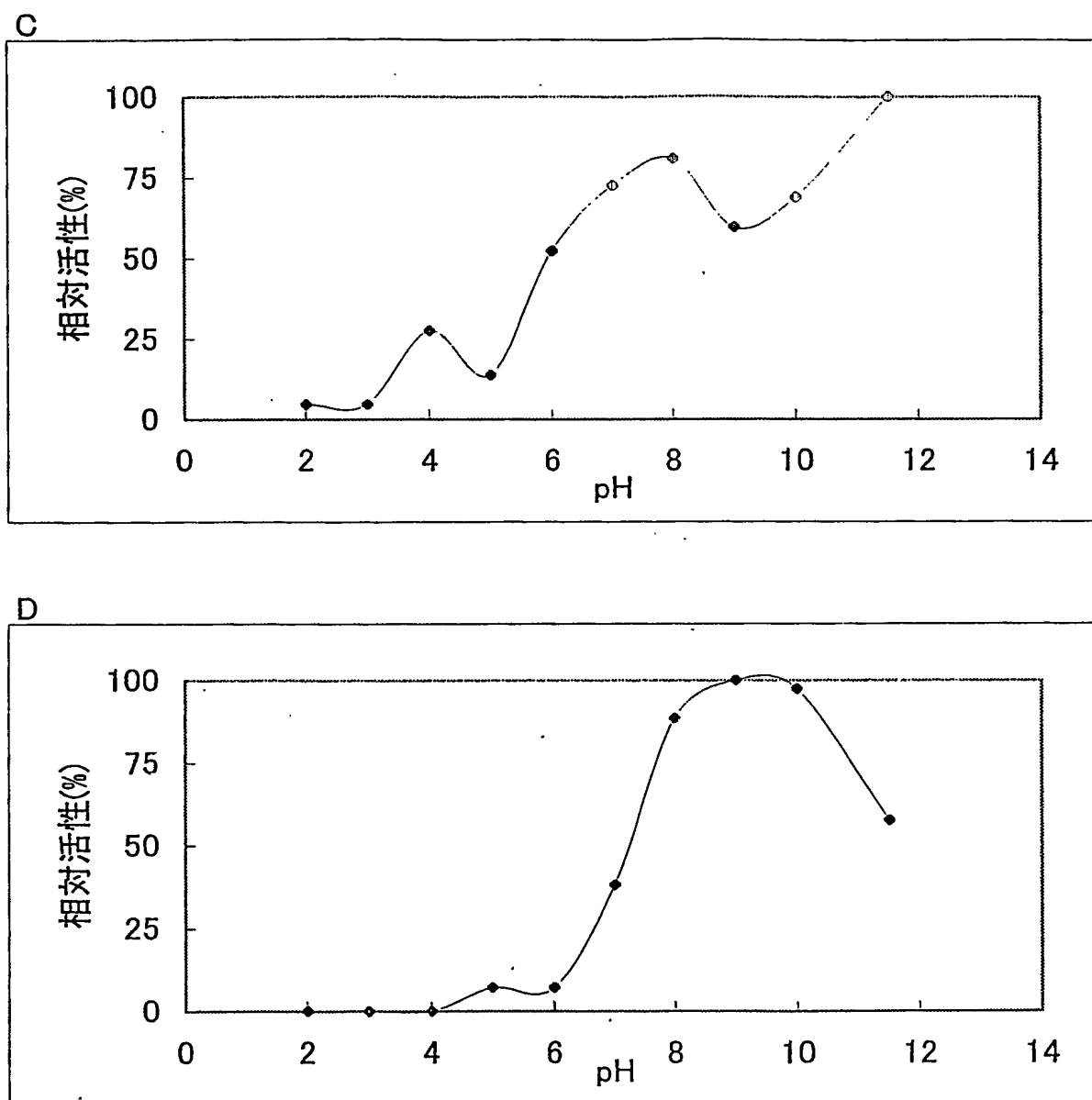
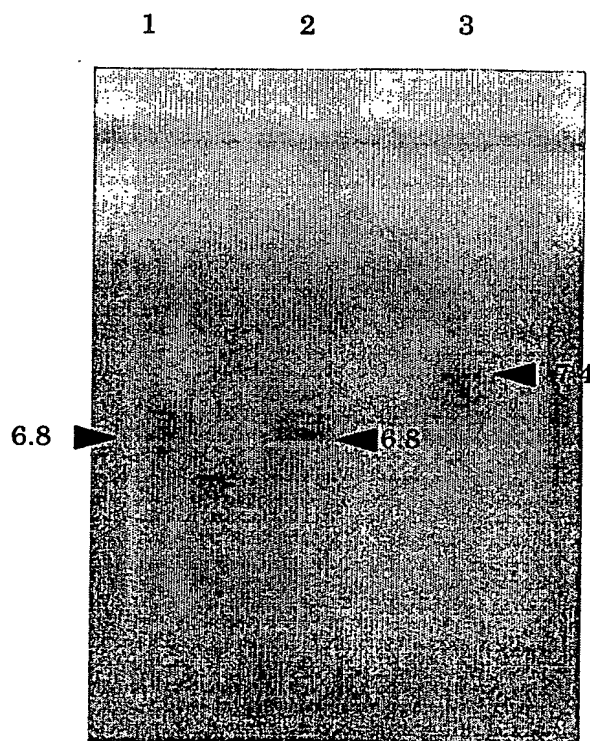


図 1 6



- 1 : 中性フェノールオキシダーゼ I I I
2 : 中性フェノールオキシダーゼ I I
3 : 中性フェノールオキシダーゼ I

図 1 7

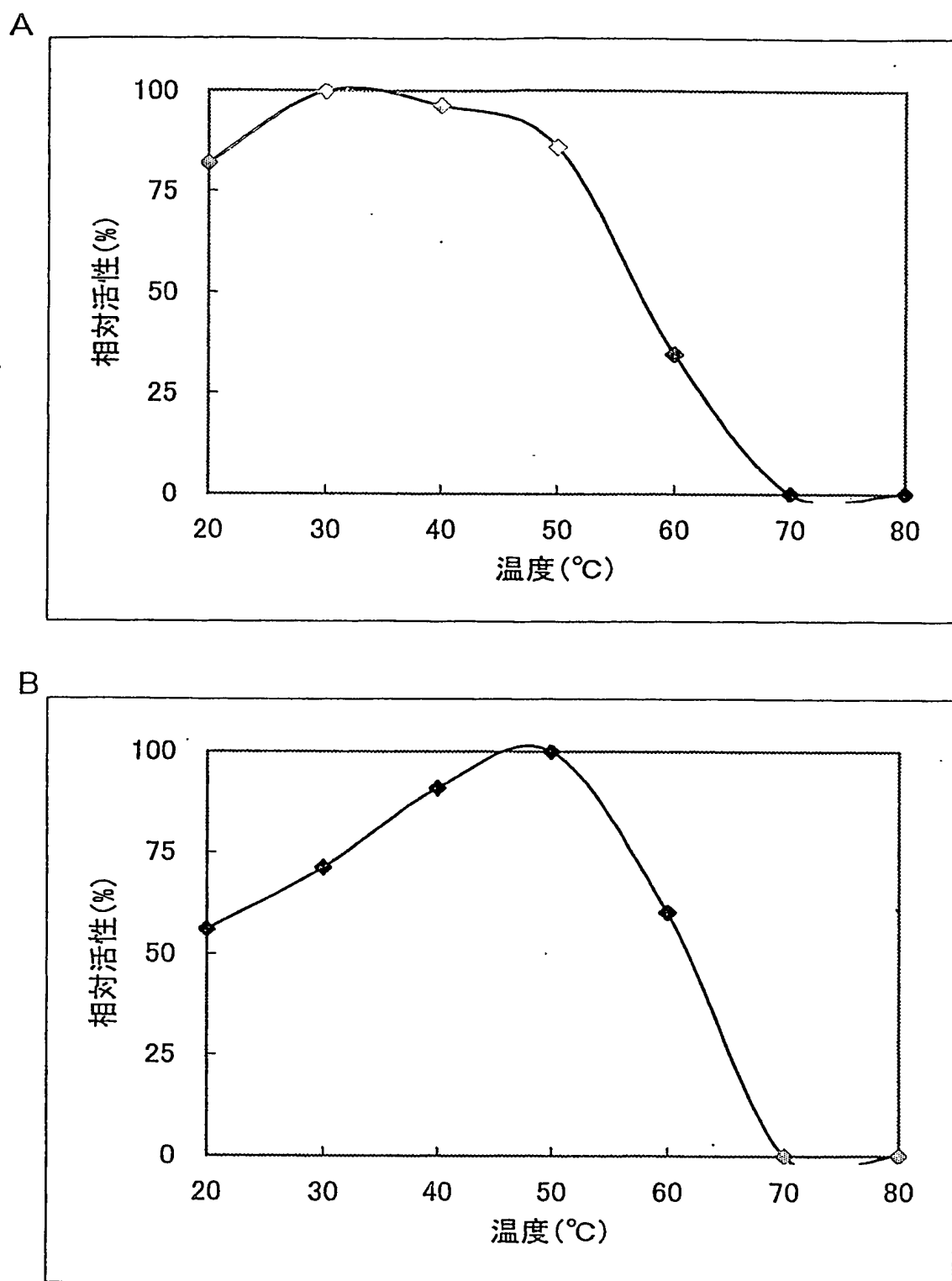
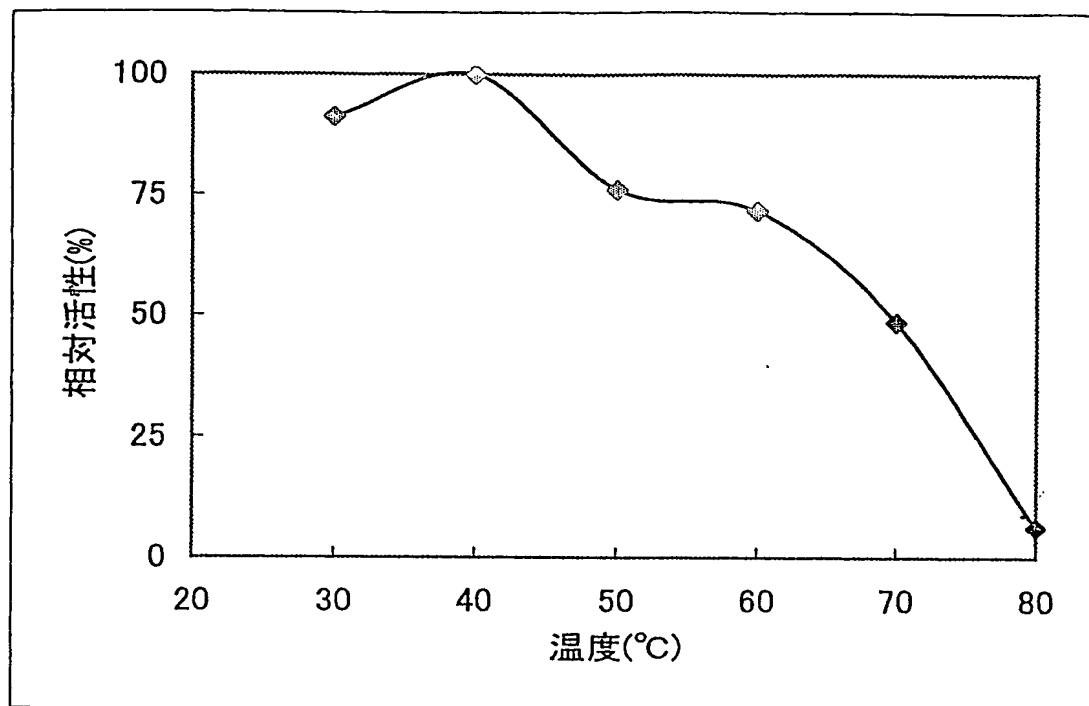


図 1 8

A



B

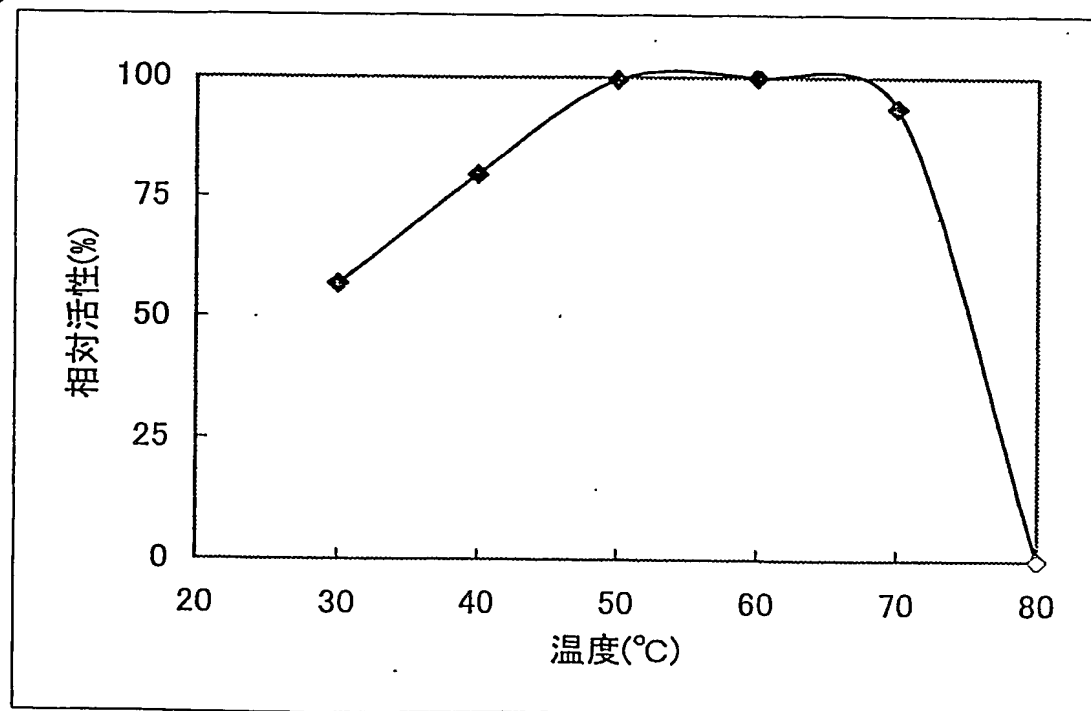


図 1 9

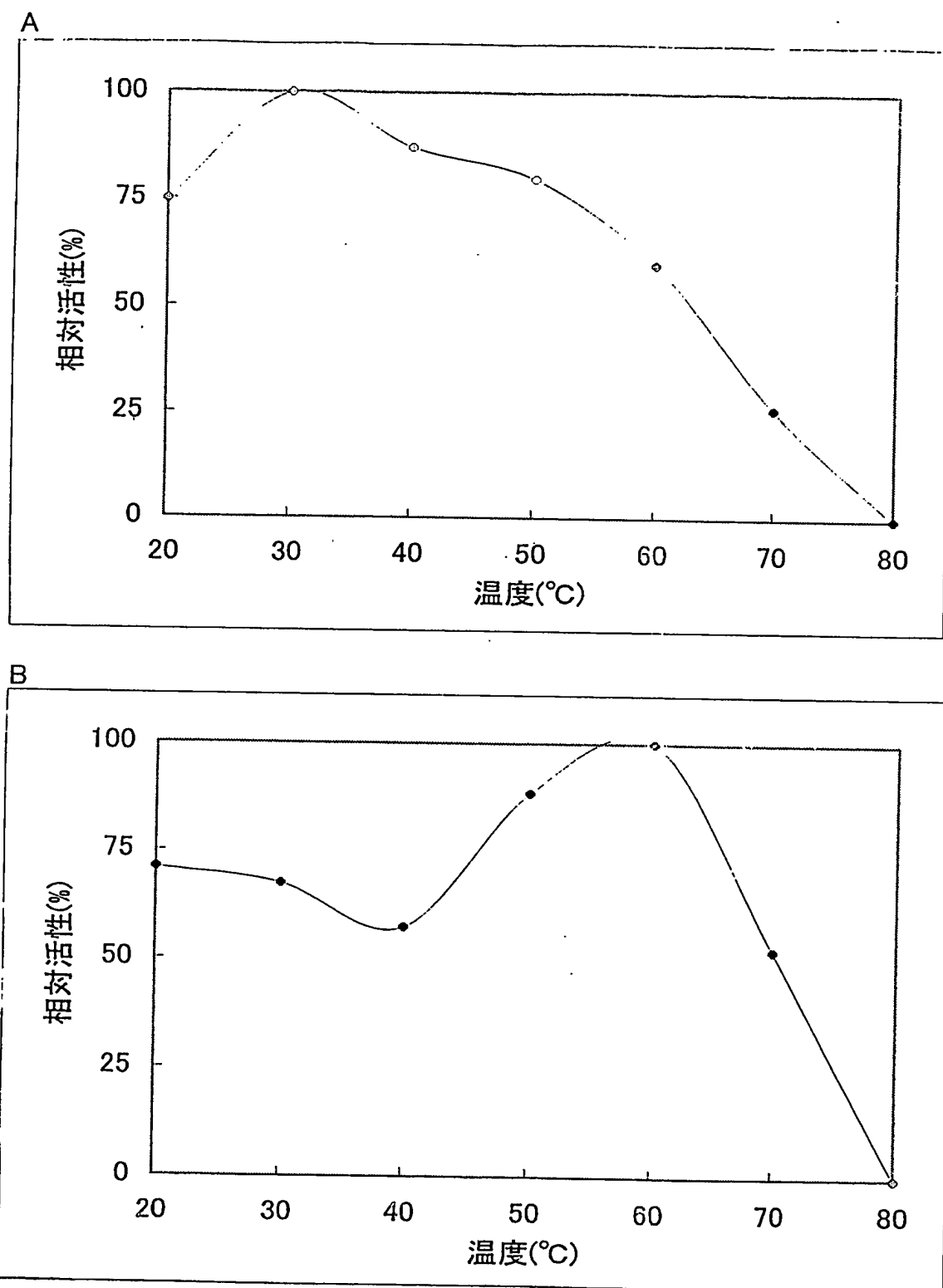


図 20-1

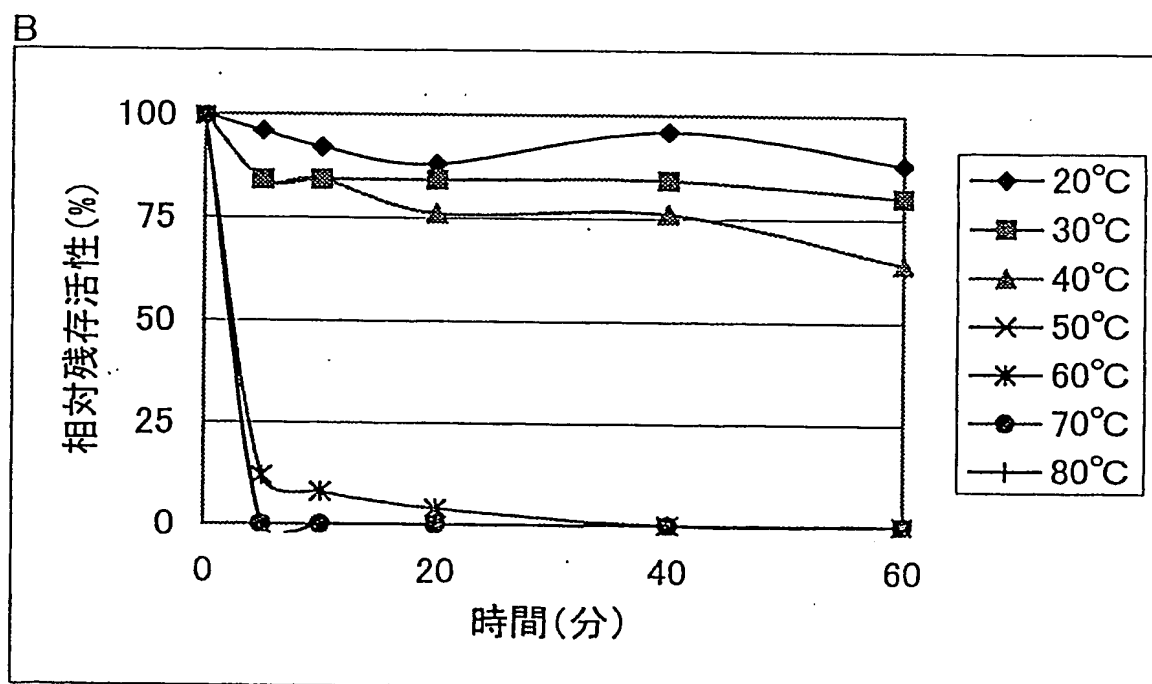
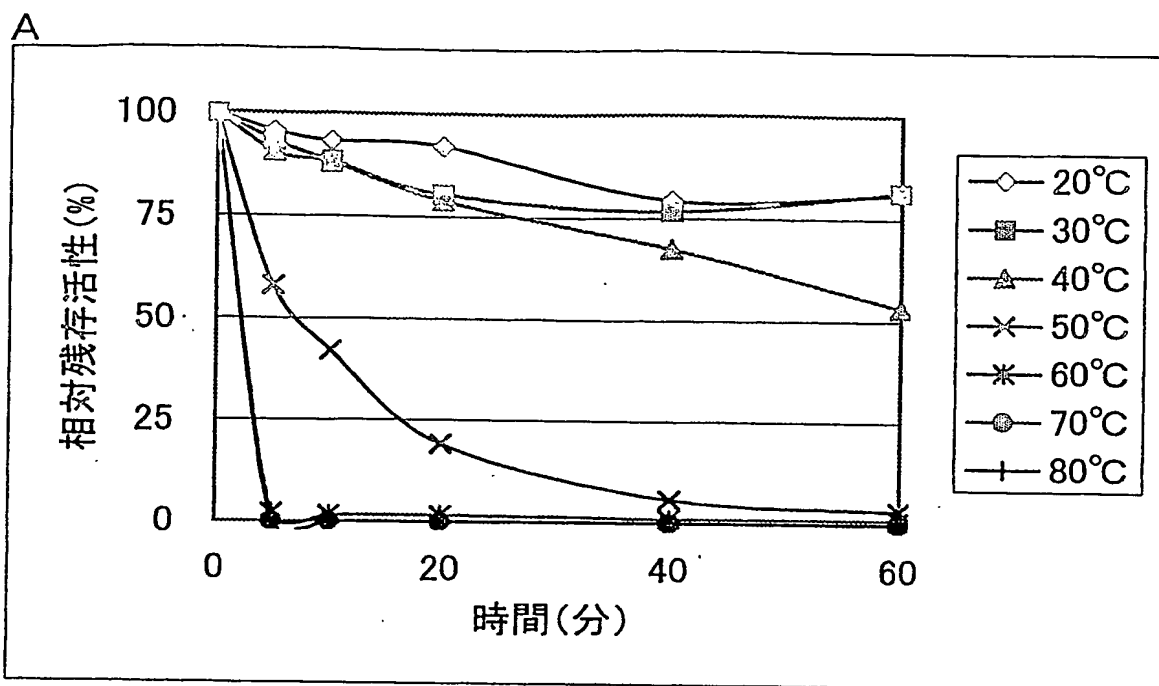


図 20-2

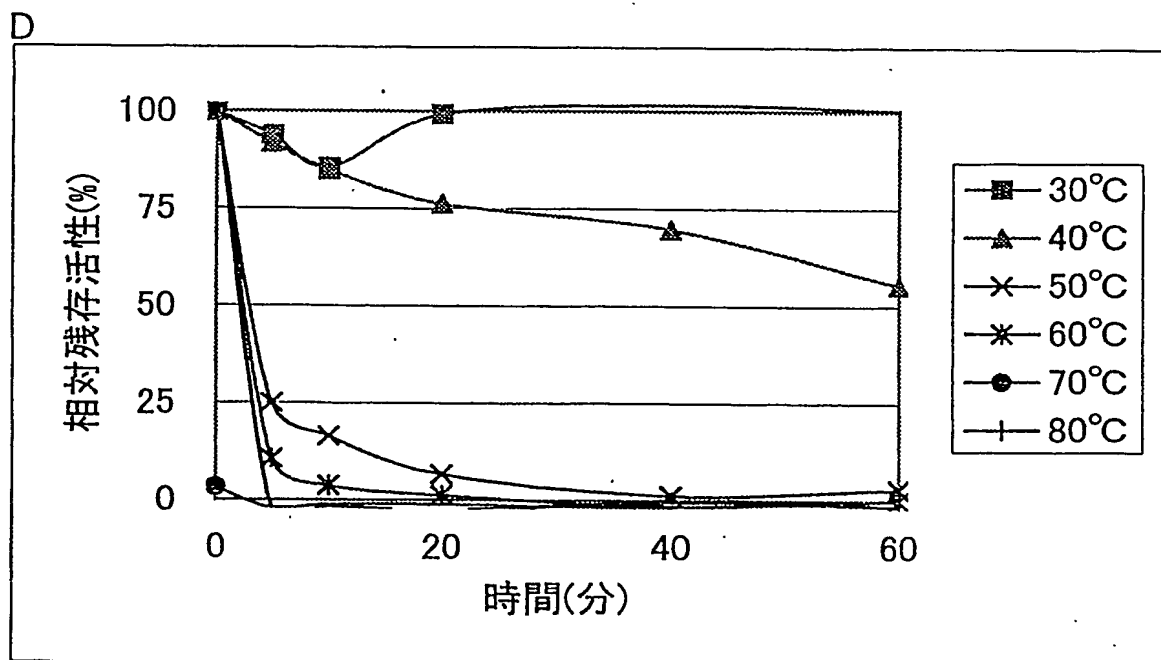
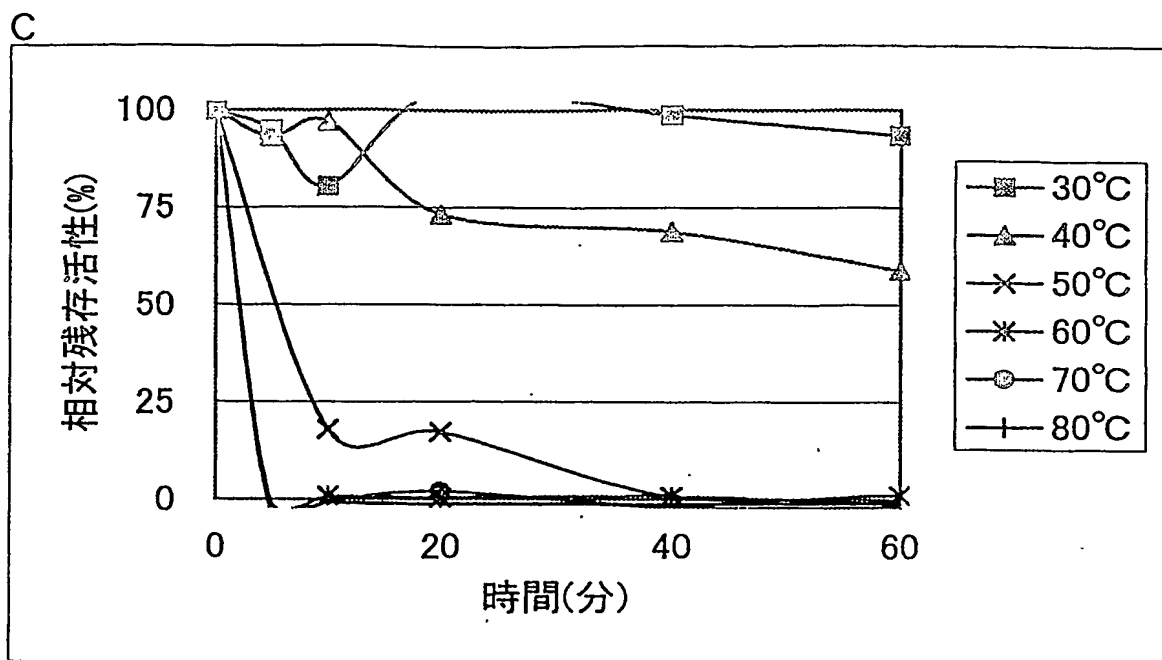


図 2 1 - 1

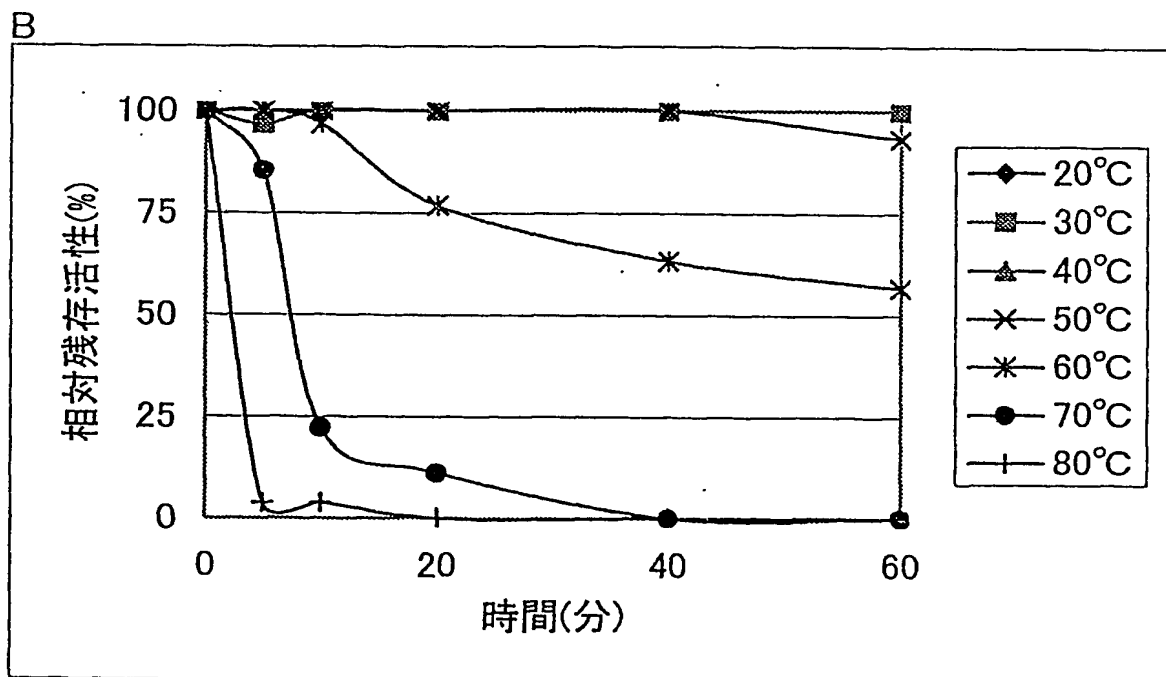
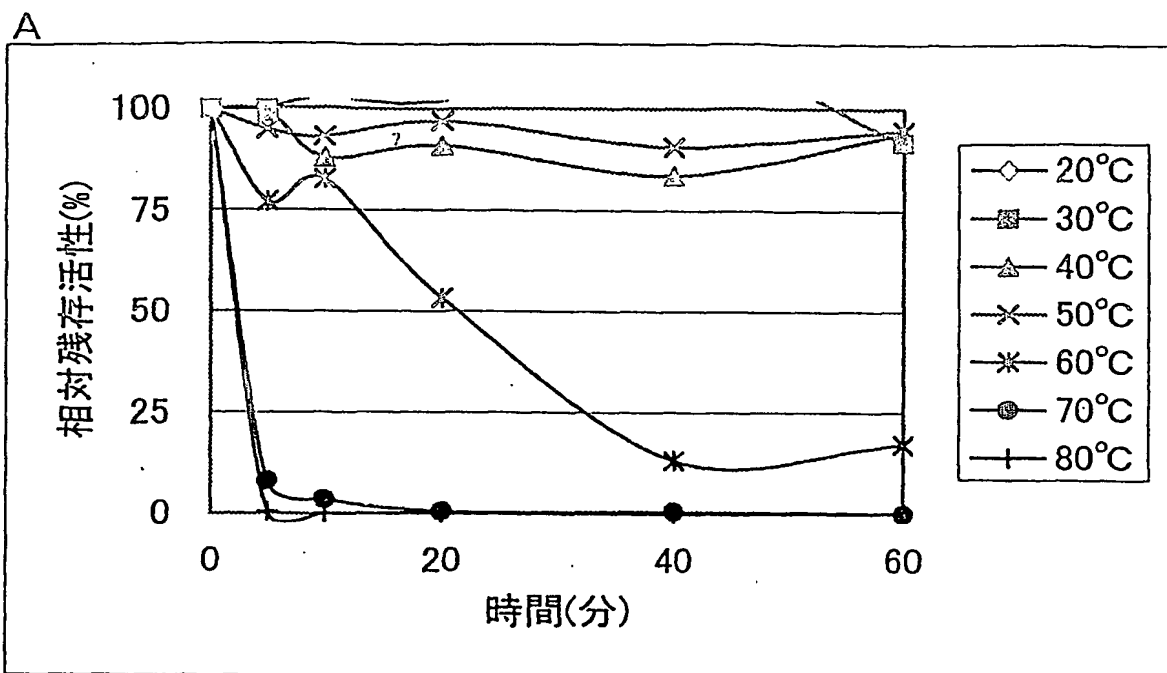


図 2 1 - 2

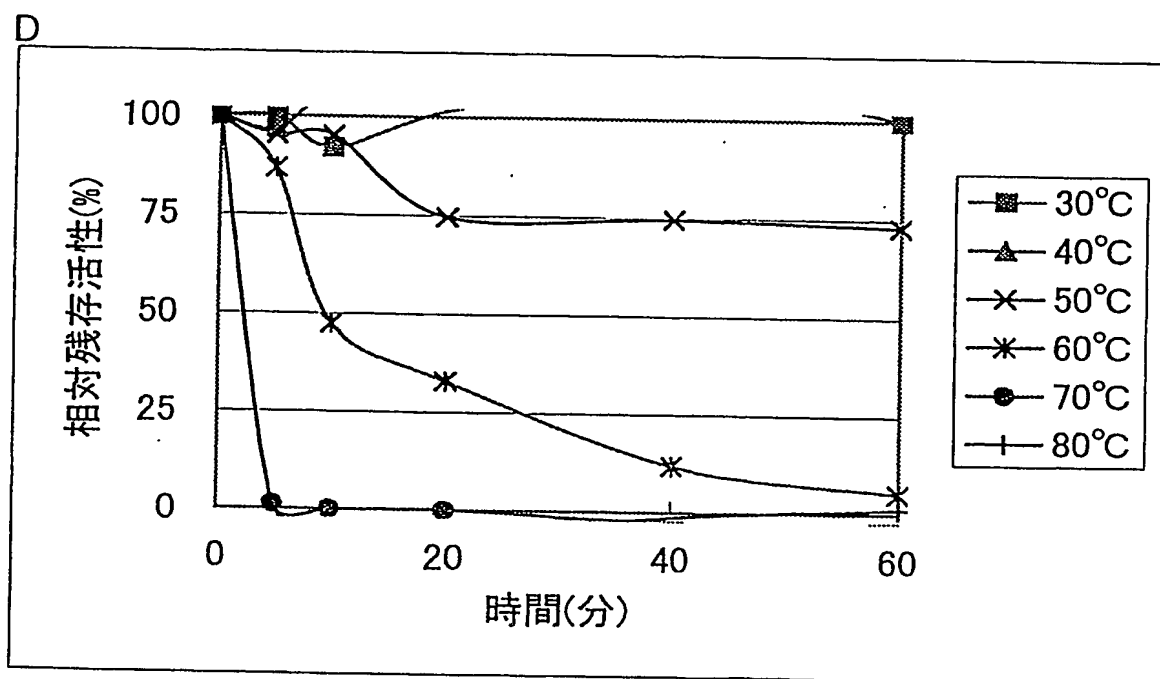
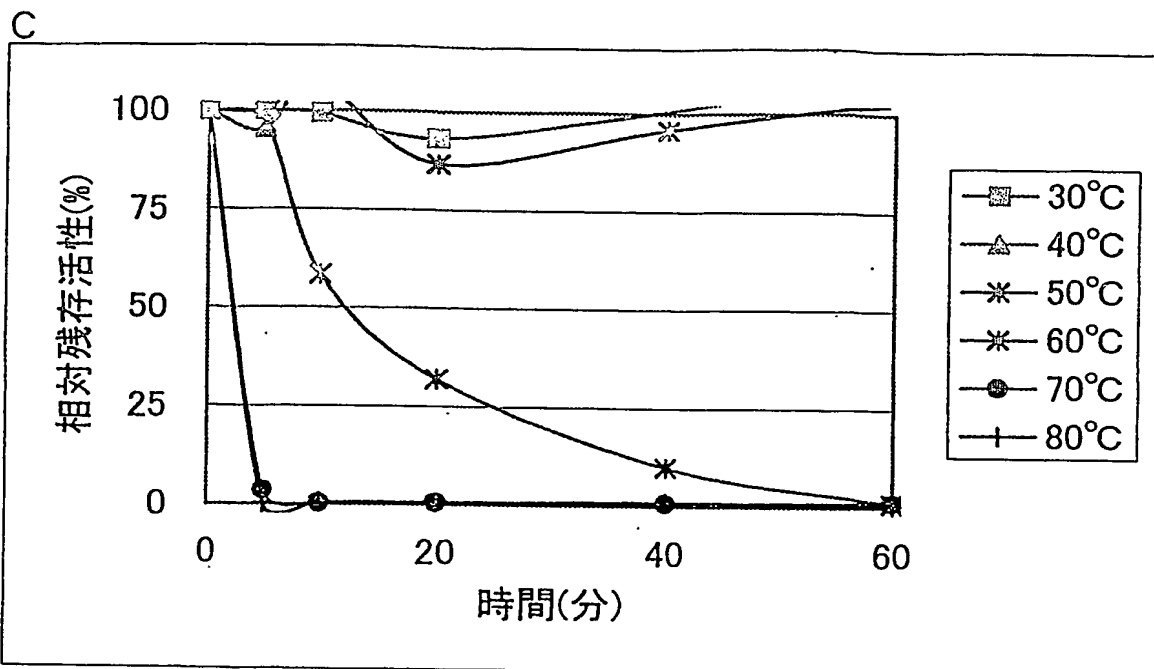


図 2 2 - 1

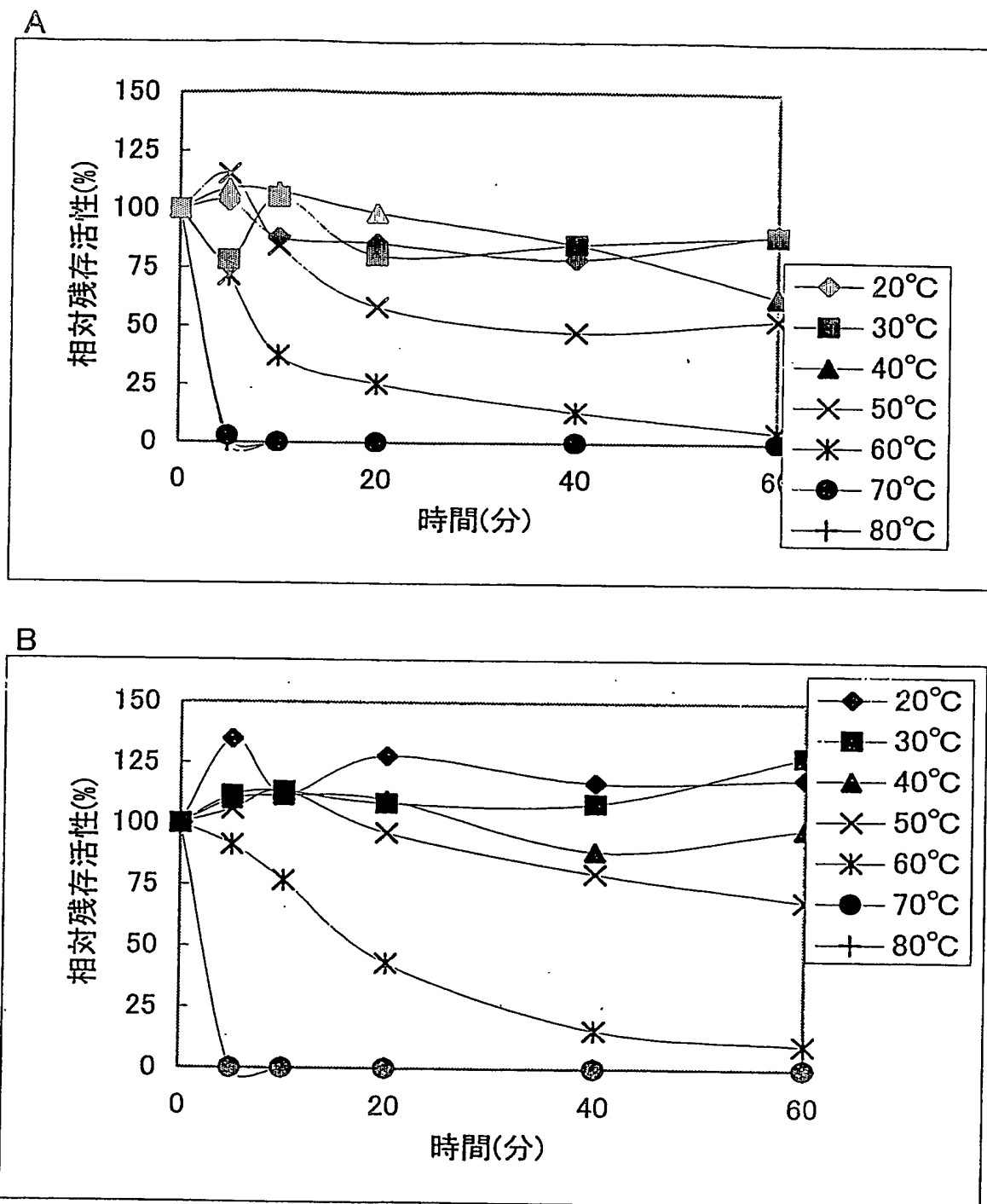
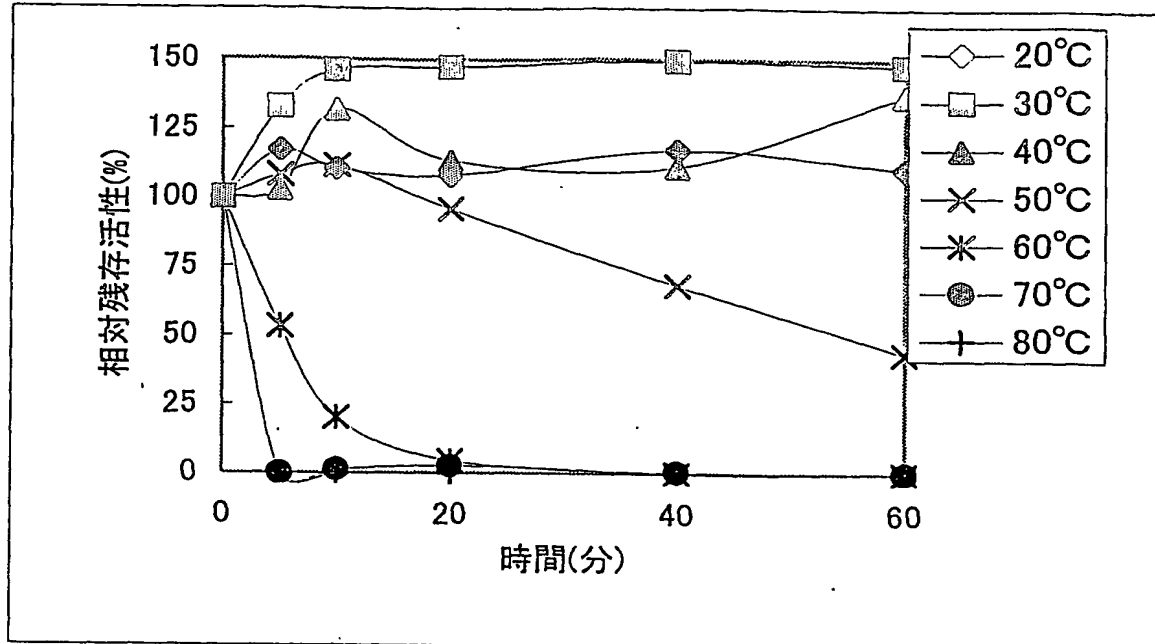
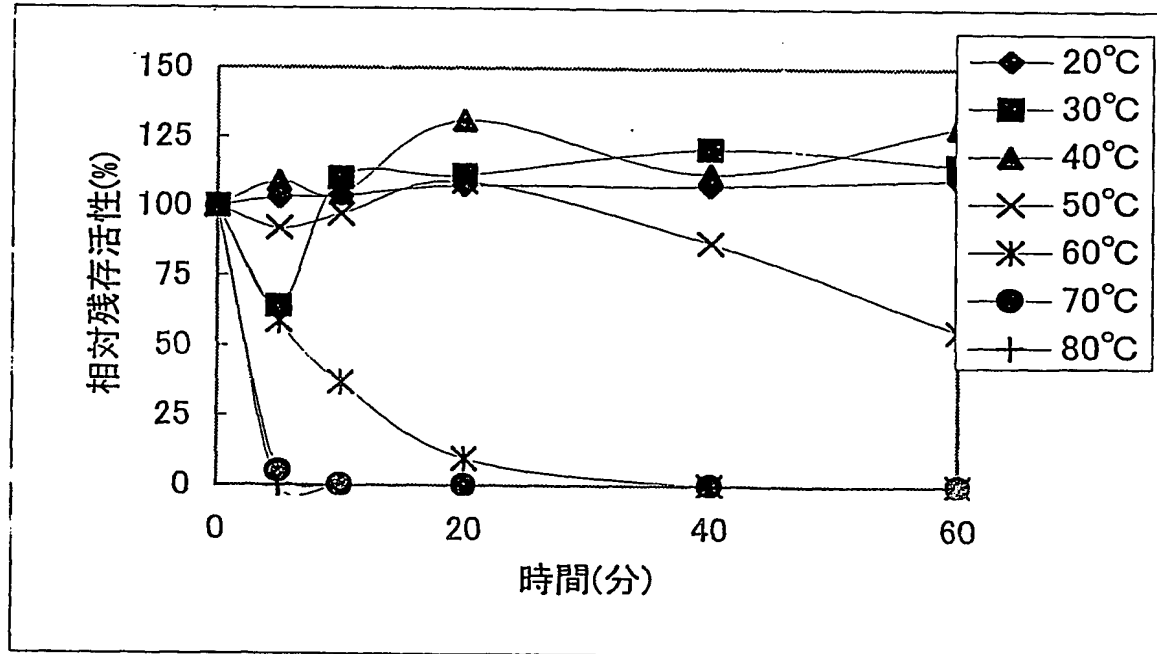


図 2 2 - 2

C



D



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/02, D06P3/08// (C12N9/02, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/02, D06P3/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> A	JP 9-206071 A (Novo Nordisk A/S), 12 August, 1997 (12.08.97), Claim 2; table 1 & WO 97/28257 A1 & AU 9714382 A & EP 877800 A1 & CN 1209839 A & US 6184014 B1	<u>1, 8</u> <u>9-11</u> 2-7
<u>Y</u> A	JP 10-501137 A (Novo Nordisk Biotech, Inc.), 03 February, 1998 (03.02.98), & WO 95/33836 A1 & AU 9526565 A & FI 9604808 A & EP 765394 A1 & BR 9507817 A & KR 97703426 A & US 5795760 A & MX 9606013 A1 & US 5981243 A & CN 1157008 A	<u>9-11</u> 1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12 May, 2004 (12.05.04)

Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002725

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	JP 2001-514513 A (Novo Nordisk A/S), 11 September, 2001 (11.09.01), & WO 98/40471 A1 & AU 9862913 A & EP 973875 A1 & CN 1250475 A & US 6136578 A	<u>9-11</u> 1-8
A	LEE J.S. et al., PRODUCTION AND ENZYMATIC PROPERTIES OF LACCASE FROM FLAMMULINA- VELUTIPES., Korean Journal of Mycology 1985, Vol.13, No.2, pages 111 to 114, (abstract) BIOSIS[online], BIOSIS Accession No.1985: 419838	1-11
E,X	WO 2004/020617 A1 (Mandom Corp.), 11 March, 2004 (11.03.04), (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N9/02, D06P3/08 // (C12N9/02, C12R1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N9/02, D06P3/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	JP 9-206071 A (ノボ ノルディスク アクティールスカブ) 1997.08.12, 請求項 2, 表 1 & WO 97/28257 A1 & AU 9714382 A & EP 877800 A1 & CN 1209839 A & US 6184014 B1	<u>1, 8</u> <u>9-11</u> 2-7
<u>Y</u> A	JP 10-501137 A (ノボ ノルディスク バイオテック, インコーポレ イティド) 1998.02.03 & WO 95/33836 A1 & AU 9526565 A & FI 9604808 A & EP 765394 A1 & BR 9507817 A & KR 97703426 A & US 5795760 A & MX 9606013 A1 & US 5981243 A & CN 1157008 A	<u>9-11</u> 1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.05.2004

国際調査報告の発送日

01.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 2001-514513 A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスカプ) 2001.09.11 & WO 98/40471 A1 & AU 9862913 A & EP 973875 A1 & CN 1250475 A & US 6136578 A	<u>9-11</u> 1-8
A	LEE J.S. et al. PRODUCTION AND ENZYMATIC PROPERTIES OF LACCASE FROM FLAMMULINA-VELUTIPES. Korean Journal of Mycology 1985, Vol. 13, No. 2, p. 111-114, (abstract) BIOSIS[online], BIOSIS Accession No. 1985:419838	1-11
EX	WO 2004/020617 A1 (株式会社マンドム) 2004.03.11 (ファミリー なし)	1-11